



# Le rôle de l'adénosine au cours de l'embryogenèse des vertébrés

Alice Tocco

## ► To cite this version:

Alice Tocco. Le rôle de l'adénosine au cours de l'embryogenèse des vertébrés. Biologie cellulaire. Université de Bordeaux, 2014. Français. NNT : 2014BORD0153 . tel-01200791

**HAL Id: tel-01200791**

**<https://theses.hal.science/tel-01200791>**

Submitted on 17 Sep 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE  
**DOCTEUR DE**  
**L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Par Alice TOCCO

**Le rôle de l'adénosine au cours de  
l'embryogenèse des Vertébrés**

Sous la direction de : Dr. Karine MASSÉ

Soutenue le mardi 28 octobre 2014 à 14h00

Membres du jury :

M. LANDRY Marc	Professeur des Universités	Bordeaux	Président
Mme. LOCKER Morgane	Maître de conférence	Orsay	Rapporteur
M. RIOU Jean-François	Chargé de recherche	Paris	Rapporteur
Mme. JONES Elizabeth	Professeur	Warwick (UK)	Examineur
M. DAIGNAN-FORNIER B.	Directeur de recherche	Bordeaux	Examineur
M. BOUÉ-GRABOT Éric	Directeur de recherche	Bordeaux	Examineur

## **Le rôle de l'adénosine au cours de l'embryogenèse des vertébrés.**

L'adénosine extracellulaire appartient à la voie de signalisation purinergique et régule divers processus physiologiques à travers l'activation de ses récepteurs spécifiques (adora). La disponibilité de cette purine dans l'espace extracellulaire est régulée par plusieurs ecto-enzymes assurant sa production ou sa dégradation, mais également par des transporteurs de nucléosides permettant son passage à travers la membrane. Chez l'adulte, le rôle de l'adénosine est assez bien connu. Cependant, l'implication de cette purine au cours de l'embryogenèse reste très peu étudiée. Pourtant, un excès d'adénosine dans les phases précoces du développement est létal chez la souris et l'oursin, démontrant l'importance de la régulation des concentrations de cette molécule de signalisation lors de l'embryogénèse. Le but de ma thèse est de comprendre le rôle de l'adénosine au cours de l'embryogenèse en utilisant l'amphibien xénope. En effet, ce modèle a permis de mettre en évidence *in vivo* l'implication de l'ADP au cours du développement de l'œil chez les vertébrés. La première partie de ce projet a permis de caractériser les acteurs de la voie de signalisation de l'adénosine chez le xénope afin d'établir la première carte comparative de leur profil d'expression embryonnaire. Cette partie a également permis de mettre en avant la phosphatase alcaline alpl pour son profil d'expression particulier, dans le rein et la rétine. La seconde partie s'est focalisée sur l'étude fonctionnelle de cette enzyme. Les expériences de perte de fonction montrent son implication lors de la formation de ces deux tissus.

**Mots clés :** Adénosine, voie de signalisation purinergique, embryogenèse, pronephros, rétine, xénope

---

## **Role of adenosine during the embryogenesis of vertebrates.**

Extracellular adenosine belongs to the purinergic signalling pathway and regulates various physiological processes through activation of specific receptors named adora. The extracellular concentration of adenosine is regulated by several ecto-enzymes involved either in its generation or in its degradation but also by nucleoside transporters enabling its exit outside or entry inside the cell. In adults, the functions of adenosine are quite well known, however, the its involvement during embryogenesis remains poorly studied. An excess of adenosine in early phases of development is lethal in mouse and sea urchins, demonstrating the importance of the extracellular adenosine level regulation during embryogenesis. The aim of my PhD is to understand the role of adenosine during embryogenesis using *Xenopus* as a vertebrate model. Indeed, the first *in vivo* evidence of the implication of the purinergic signalling pathway during vertebrate development, and in particular of ADP during eye formation has been demonstrated using this model. The first part of this project was to characterize all the adenosine signalling pathway actors in *Xenopus* in order to generate the first comprehensive and comparative embryonic expression map of these genes. This work allowed me to select the alkaline phosphatase alpl for functional studies based on its specific expression profile, in the retina and kidney. These functional studies, mostly carried out by knockdown experiments, constituted the second part of this PhD and showed the implication of this enzyme during the eye and kidney development.

**Keywords :** Adenosine, purinergic signalling pathway, embryogenesis, pronephros, retina, *Xenopus*

---

## **Unité de recherche**

**C.I.R.I.D. UMR CNRS 5164**

Université de Bordeaux, campus Segalen, Bat. 1B, rdc, 146 rue Léo Saignat 33076  
BORDEAUX

*Je dédie cette thèse à mon Papy, qui aurait été fier de moi...*

Je tiens avant tout à remercier **Karine Massé** pour m'avoir encadré durant mes travaux de thèse, pour ses conseils scientifiques, son aide et son écoute pendant ces trois ans. Clo-clodette, mais pas que ! Grâce à toi, j'ai pu mettre un pied dans le monde fabuleux du crapaud.

Je remercie ensuite les **membres du jury** : Marc Landry, Morgane Locker, Jean-François Riou, Elisabeth Jones, Bertrand Daignan-Fornier et Eric Boué-Grabot. C'est un honneur pour moi que vous ayez accepté si rapidement d'évaluer mes travaux de recherche.

Je remercie également le professeur **Jean-François Moreau** de m'avoir accueilli au sein du laboratoire CIRID.

Je tiens aussi à remercier chaleureusement **Pierre Thiébaud** pour son soutien, ses corrections, ses conseils et nos discussions autour du micro-injecteur, ainsi que **Nadine Thézé** pour sa gentillesse, son écoute et son aide.

Un grand merci à **Emilie**, mon acolyte de thèse, amie et voisine, pour son soutien moral pendant nos deux années de thèse communes, sa joie de vivre, son écoute, ses conseils (scientifiques ou non !), nos trajets à pied ou en bus, par tous les temps, sa motivation (ou non) pour les magiques cours de zumba d'Anne-Laure, pour les paniers de fruits et légumes, les spectacles au Grand Théâtre, les petits apéros improvisés et ses petites attentions.

Je tiens également à remercier **Sandrine** pour tous ses conseils et son aide au cours de ces trois ans, son rire, ses blagues, ses danses, ses chansons, ses mimes, mais avant tout pour son amitié et sa sympathie. Un petit clin d'œil à Séverine, son amie de tous les instants, ainsi qu'à ses deux Loulous.

Merci à **Marie** et **Inès**, mes deux anciennes voisines de bureau et amies, pour leur bonne humeur, leurs blagues, les sorties à « l'autre petit bois » et ailleurs (Bordeaux, Paris et bientôt Londres). Copines de galères scientifiques (surtout les Western-Blot)! Merci aussi à **Camille B**, la fan de Coca-cola (light!) numéro 2, après moi, pour ses conseils scientifiques (en HIS notamment), son amour pour la biologie, ses encouragements et nos discussions, autours d'un coca.

Merci aussi à **Corinne Faucheux** et **Philippe Veschambre** pour leurs conseils, leur écoute et leur bonne humeur.

Je remercie également, **Hélène Bœuf** et **Vincent Praloran**, mes voisins de bureau très « expressifs », pour leurs conseils durant ses trois ans.





Je remercie également **Aya** pour sa gentillesse, sa bonne humeur et son courage de tous les instants, ainsi qu'**Aurélie** pour son humour, ses anecdotes croustillantes et ses « coups de gueule », **Arnaud**, mon camarade de thèse synchronisé, le pro de l'informatique, pour ses blagues, sa gentillesse et son aide à tout moment, **Philippe Brunet de Lagrange** pour ses passages humoristiques dans le bureau des étudiants et **Xavier** pour ses blagues à 2 francs (non non, même pas 50 centimes d'euros).

Merci également à **Benoît Pinson**, pour son aide et sa participation à mon projet de thèse, sa gentillesse et sa bonne humeur.

Je remercie ensuite mes amis **TBM doc's** qui m'ont permis de voir la thèse autrement et de m'aérer la tête, sans oublier tous les étudiants qui ont travaillé à mes côtés : Rémi E, Nina, Elodie, Hannah, Camille C, Yann, Savitha, Vladimir, Carlo, Paul, Ophélie, Sabine, Romain, ainsi que Liliane, Camille K et Jenny (mes camarades de journal club !). Et un grand grand merci à Adrien pour m'avoir sauvé la vie...

Je remercie **Annie** et **Richard**, ainsi que tout l'**étage** pour leur aide et leurs précieux conseils tout au long de ma thèse.

Pour finir, je remercie **Andrea** pour tout ce qu'il m'apporte au quotidien, **mes parents** et **ma famille** pour leur soutien, leur aide de chaque instant et leur amour inconditionnel et **mes amis** de toujours, qui se reconnaîtront, pour être restés compréhensifs et disponibles.

Même si l'aventure de la recherche s'arrête ici pour moi, je n'oublierai jamais tout ce que j'ai appris au cours de ma thèse, que ce soit sur le plan scientifique ou humain.

Et enfin, merci à toutes les personnes présentes le jour de ma thèse, venus spécialement pour me soutenir (de Bordeaux et d'ailleurs). Votre présence, vos attentions et vos petits mots gentils m'ont fait chaud au cœur. Un immense merci aux organisatrices du buffet, je savais que je pouvais compter sur vous. J'ai passé une excellente journée grâce à vous tous !

**Un grand merci à tous !!!**



# Table des matières

## INTRODUCTION

I-	La voie de signalisation purinergique.....	13
A.	L'ATP, molécule extracellulaire .....	13
1.	Historique .....	13
2.	Mécanismes de libération .....	15
B.	Les acteurs de la voie de signalisation purinergique .....	19
1.	De l'ATP à l'AMP.....	19
2.	Les acteurs de la voie de signalisation de l'adénosine .....	27
II-	Rôle de l'adénosine extracellulaire .....	59
A.	A l'âge adulte .....	59
1.	Physiologie et pathophysiologie du système nerveux .....	61
2.	Immunité et inflammation .....	65
3.	Physiologie du rein et pathophysiologies rénales.....	67
4.	Physiologie et pathologies du système cardiovasculaire .....	69
5.	Prolifération et différenciation des cellules souches .....	69
6.	Cancer.....	71
B.	Au cours de l'embryogenèse .....	75
1.	Expression .....	75
2.	Etudes fonctionnelles.....	77
III-	Le modèle xénope .....	81
A.	Présentation du modèle <i>Xenopus laevis</i> .....	81
1.	Historique .....	81
2.	<i>Xenopus laevis</i> dans la nature et au laboratoire .....	83
B.	Les avantages du modèle <i>Xenopus laevis</i> :.....	89
1.	Par rapport à <i>Xenopus tropicalis</i> .....	89
2.	Par rapport au poisson zèbre.....	91
3.	Par rapport aux mammifères .....	91
C.	Les outils développés chez <i>Xenopus laevis</i> pour étudier les fonctions des gènes .....	93
1.	Les ovocytes et leurs utilisations en biologie .....	93
2.	Les calottes animales: test ex vivo d'activité biologique d'une protéine .....	93
3.	Criblages génétiques par des approches de "forward genetics" .....	95
4.	Modifications de l'expression de gènes : Surexpression ou knock-down .....	95
5.	Perturbations génomiques par transgénèse.....	97



6. Mutagenèse dirigée.....	97
D. Modèle d'étude pour l'embryogenèse .....	99
IV- Projet de thèse .....	107
<b>Première partie: Caractérisation des acteurs de la voie de signalisation de l'adénosine</b>	
I- Introduction .....	109
A. Profil d'expression.....	109
1. De l'ATP à l'AMP.....	109
2. La voie de signalisation de l'adénosine.....	117
B. Etudes fonctionnelles.....	119
II- Résultats .....	121
A. Article .....	125
B. Résultats complémentaires .....	140
1. Matériel et méthodes .....	140
2. Résultats : Profils d'expression spatio-temporels.....	148
3. Conclusion et discussion .....	162
<b>Deuxième partie: Etude de la phosphatase alcaline alpl</b>	
I- Introduction .....	170
A. Développement de l'œil chez <i>Xenopus laevis</i> .....	170
1. Spécification de la rétine .....	170
2. Spécification du cristallin .....	172
3. Différenciation de l'œil .....	172
4. Rétinogenèse .....	172
B. Développement du rein chez <i>Xenopus laevis</i> – la néphrogenèse .....	176
1. Spécification du mésoderme pronephrique .....	176
1. Morphogenèse de l'ébauche pronephrique.....	176
2. Différenciation du néphron.....	178
II- Résultats .....	180
A. Article .....	182
B. Perspectives: Results to be generated to complete this publication .....	208
C. Conclusion et discussion .....	218
1. L'alcaline phosphatase tissu-non spécifique présente un profil embryonnaire d'expression tissu spécifique.....	218
2. Rôle de l'alpl.a dans la formation de l'oeil .....	218
3. Rôle de l'alpl.a dans la formation du pronephros.....	222
4. Activité phosphatase nécessaire aux rôles embryonnaires de l'alpl.a ? .....	224



5. Mécanisme d'action de l'alpl.a dans la formation de ces tissus : Implication de la voie de signalisation purinergique ? .....	226
<b>CONCLUSION</b> .....	230
<b>REFERENCES</b> .....	236
<b>ANNEXES</b> .....	258



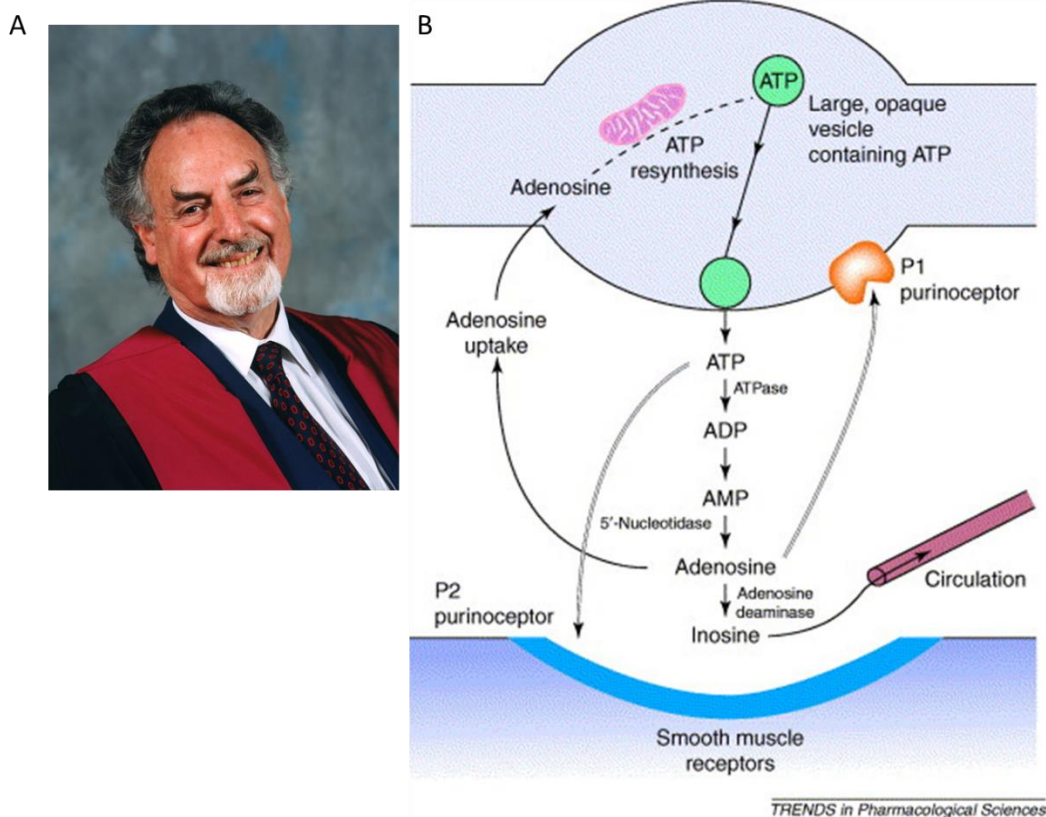


Figure 1 : **Le professeur Geoffrey Burnstock (A) et son hypothèse de neurotransmission purinergique (B).** (A) Photographie prise sur le site de l'université UCL de Londres (University College London) (<http://www.ucl.ac.uk>). (B) La jonction neuromusculaire est représentée avec la cascade de synthèse, stockage, libération et inactivation de l'ATP. L'ATP, stocké dans les vésicules des cellules nerveuses est libéré par exocytose pour agir sur les récepteurs purinergiques P2 présents du côté post-jonction sur les muscles lisses. L'ATP est dégradé par les ATPase et 5'-nucléotidase extracellulaires en adénosine. L'adénosine formée peut être soit recyclée en ATP à l'intérieur de la cellule nerveuse, soit reconnue à sa surface (pré-jonction) par les récepteurs P1 pour moduler la libération des neurotransmetteurs, soit dégradée en inosine pour être éliminée dans la circulation sanguine. D'après [1].

# Introduction générale

---

## I- La voie de signalisation purinergique

### A. L'ATP, molécule extracellulaire

#### 1. Historique

La molécule d'adénosine triphosphate (ATP) a été découverte en 1929 par Karl Lohmann [2]. Par la suite, les rôles intracellulaires de cette molécule ubiquitaire ont été fortement étudiés et décrits. En effet, l'ATP est la source d'énergie cellulaire dans tous les organismes, agit comme cofacteur enzymatique et constitue les acides nucléiques. Cependant, quelques études se portaient également sur son activité physiologique extracellulaire, notamment au niveau cardiaque [3] et de la neurotransmission [4], sans susciter un grand intérêt de la part de la communauté scientifique.

Ce n'est qu'en 1972 que Geoffrey Burnstock formule l'hypothèse de neurotransmission purinergique en décrivant l'ATP et ses dérivés comme des molécules de signalisation extracellulaire dans la jonction neuromusculaire (**figure 1**) [5]. Mais, une forte résistance à l'égard de cette hypothèse a persisté jusqu'au clonage et à la caractérisation des différents sous-types de récepteurs spécifiques à l'ATP (P2) et à l'adénosine (P1) [6]. Ceci en partie car il était difficile pour les biochimistes de concevoir qu'une molécule ubiquitaire, source d'énergie cellulaire et impliquée dans de nombreux cycles métaboliques ait également un rôle de signalisation extracellulaire [1].

Puis, grâce à la démonstration de la transmission synaptique purinergique dans le cerveau au début des années 1990s [7], ainsi que l'existence d'ectonucléotidases à la surface cellulaire, la voie de signalisation purinergique a gagné en reconnaissance [1]. De plus, il a été démontré que cette purine peut être libérée dans l'espace extracellulaire par un grand nombre de cellules vivantes, alors qu'il était admis que seules les cellules en lyse ou en «mort cellulaire», ou endommagées suite à des conditions anormales telles que l'hypoxie, libéraient de l'ATP [8]. En effet, l'ATP peut être relâché par les neurones au niveau des synapses par exocytose. Cependant, les cellules non neuronales telles que les cellules épithéliales, endothéliales et cellules gliales peuvent libérer l'ATP par divers mécanismes physiologiques (voir paragraphe suivant).

Depuis, la signalisation purinergique extracellulaire a été démontrée comme impliquée dans des signalisations de type « court-terme » lors de la neurotransmission, la neuromodulation, la sécrétion, la chimioattraction et l'inflammation, ainsi que de type « long-terme » dans la prolifération cellulaire, la

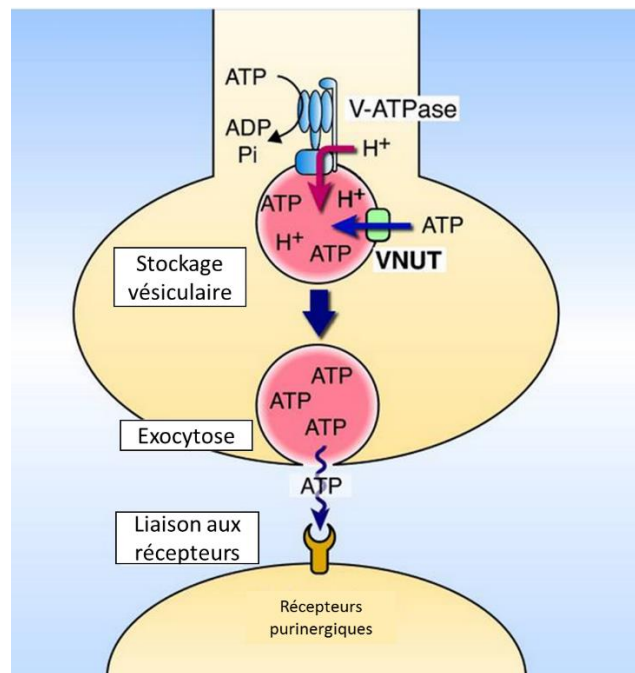


Figure 2 : **Mécanisme de libération extracellulaire de l'ATP par exocytose régulée.** Le transporteur VNUT et la pompe V-ATPase sont représentés. D'après [9].

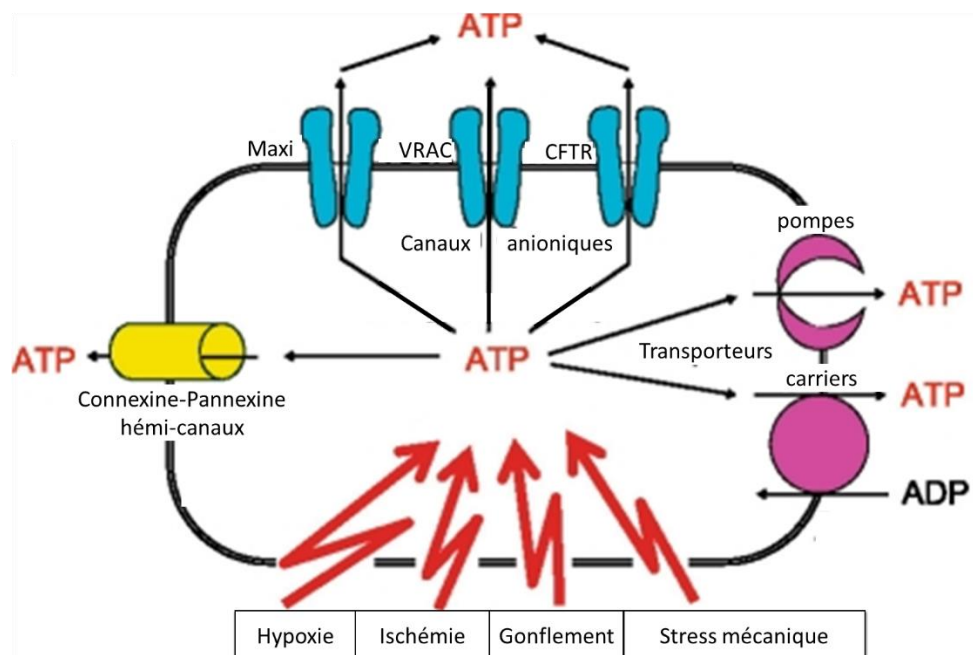


Figure 3 : **Mécanismes de libération conductive de l'ATP en réponse à l'hypoxie, l'ischémie, le gonflement cellulaire ou autre stress mécanique.** D'après [10].

différenciation cellulaire, la motilité cellulaire, la mort cellulaire au cours du développement, la régénération, les cancers ou encore le vieillissement [11]. Elle régule ainsi la physiologie d'un grand nombre d'organes, tels que le système nerveux central et périphérique, le système cardio-vasculaire, le système immunitaire, le système respiratoire, système digestif, système urogénital etc... [12]. Ainsi, l'ATP est la molécule de signalisation la plus omniprésente chez les vertébrés, mais aussi présente chez les invertébrés et plantes.

## 2. Mécanismes de libération

En condition normale, la concentration intracellulaire de l'ATP est comprise entre 4 et 8 mM, et celle extracellulaire de l'ordre du nM. L'ATP intracellulaire, peut être libéré par différents mécanismes de transport en réponse à un stress cellulaire mécanique, ou à un changement d'environnement [8, 10].

### a) *Exocytose régulée*

L'exocytose régulée fait intervenir un transporteur ionique à douze domaines transmembranaires appelé VNUT pour « vesicular nucléotide transporter » ou SLC17a9 (**figure 2**) [9]. Ce transporteur utilise le gradient électrochimique de la pompe à protons V-ATPase pour faire entrer l'ATP cytosolique à l'intérieur de granules spécifiques (synaptique dans les cellules neuroendocrines ou de sécrétion dans les cellules exocrines). La vésicule est ensuite transportée par les filaments de cytosquelette jusqu'à la membrane plasmique, avec laquelle elle va fusionner pour libérer l'ATP par exocytose calcium dépendante.

### b) *Libération conductrice*

#### (1) Pores membranaires

Il existe des pores membranaires, appelés connexines et pannexines et associés aux «gap junctions», permettant le passage intercellulaire de l'ATP, mais également sa libération dans l'espace extracellulaire (**figure 3**).

#### Connexines

Les connexines sont des hémi-canaux composés d'un assemblage de sous-unités appelées « connexons » provenant de deux cellules adjacentes et permettant le passage de molécules entre ces cellules. La plupart de ces pores sont perméables à l'ATP et à des petits colorants, et leur ouverture est induite par une dépolarisation membranaire (supérieur à +40mV) ou par une diminution de la concentration en  $Ca^{2+}$  extracellulaire [13]. Des analyses physiologiques, pharmacologiques et génétiques supportent l'hypothèse que les connexines permettent la libération d'ATP dans une grande variété de types cellulaires [8].



## Pannexines

Les pannexines (PANX1 à 3) sont composées de six à huit sous-unités (pannexons) et forment un canal perméable à l'ATP [14]. Leur ouverture n'est pas influencée par le calcium extracellulaire et peut avoir lieu avec un potentiel membranaire normal. Cependant, l'ouverture de la PANX1 peut être régulée par l'activation de la voie de signalisation Rho [15] ou par l'ATP extracellulaire, agissant comme rétrocontrôle négatif [16] ou par des potentiels d'oxido-réduction [17]. De nombreuses études pharmacologiques et génétiques sur la PANX1 ont permis de montrer que ce pore est exprimé dans des types cellulaires très variés, alors que l'expression de la PANX3 est réduite à quelques tissus [8].

### (2) Canaux anioniques conducteurs d'ATP

Différents types de canaux anioniques sont impliqués dans la libération de l'ATP extracellulaire sous forme anionique (**figure 3**) [8, 10].

#### Maxi-canaux

Les maxi-canaux présentent un large diamètre (1,3nm) permettant le passage de molécules de signalisation comme l'ATP, l'UTP et le glutamate [18]. Ces canaux sont également exprimés dans un très grand nombre de types cellulaires et sont activés par le gonflement osmotique cellulaire, un stress salin ou une ischémie [10]. Cependant, le mécanisme de réponse à l'activation de ces canaux n'est pas clair.

#### VRAC

Les canaux VRAC pour « Volume-Regulated Anion Channels » sont perméables l'ATP et sont activés en réponse à un changement environnemental de la cellule comme l'hypoxie ou lors d'un gonflement cellulaire osmotique [19, 20].

#### CFTR

Le canal CFTR pour « Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator » est associé à la libération d'ATP. Ce transporteur appartient à la famille des transporteurs ABC pour « ATP-binding carrier » [10].

### (3) Transporteurs

Le transport de l'ATP par les transporteurs ABC peut avoir lieu de manière active, par liaison de l'ATP au site NBD (nucleotide-binding domains) initiant un cycle de changements conformationnels, ou par transport conductif comme dans le cas du CFTR [10]. Ces transporteurs ABC peuvent également être associés à différents mécanismes de libération de l'ATP, afin de faciliter son transport conductif ou non, ou son exocytose [21].

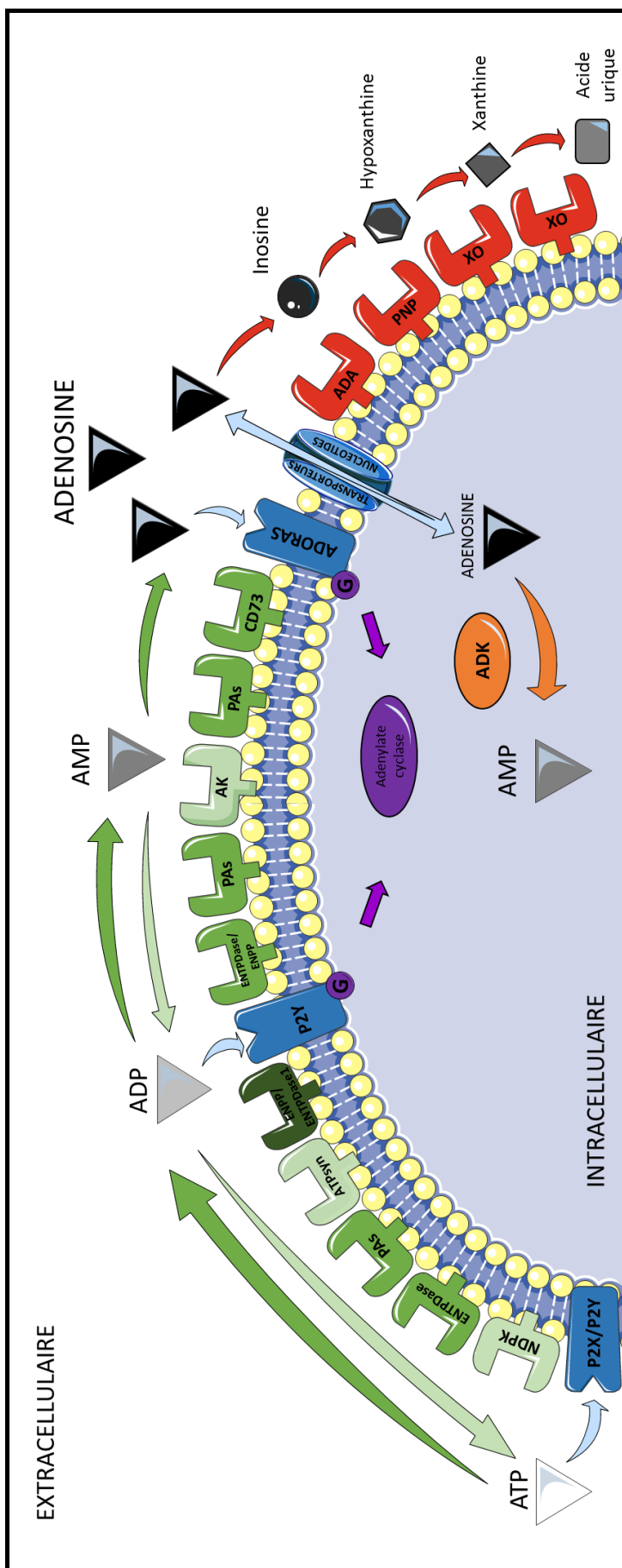


Figure 4: **Représentation de la voie de signalisation purinergique** incluant les ectonucleotidases permettant la production d'ADP, AMP et adénosine (en vert moyen et foncé), les enzymes reverses pour la production d'ADP et ATP (en vert clair), les enzymes de dégradation de l'adénosine (extracellulaire en rouge et intracellulaire en orange), les récepteurs P2 spécifiques à l'ATP et l'ADP et les récepteurs ADORA (P1) et transporteurs de nucléotides spécifiques à l'adénosine (en bleu). ADA: adenosine deaminase; ADK: adenosine kinase; AK: adénylate kinase; ATP syn: ATP synthase; CD73: ecto-5'-nucleotidase; ENPP: ectonucleotide pyrophosphate/phosphodiesterase; ENTPDase: ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase; NDPK: NDP kinase; PAs: phosphatases alcalines et acides; PNP: purine nucleoside phosphorylase; XO: xanthine oxydase.

Le transporteur « ADP/ATP carrier » ou ACC permettant l'échange d'ADP et d'ATP à la membrane interne mitochondriale serait également capable de libérer l'ATP cytosolique dans l'espace extracellulaire [10, 22].

Par ces différents mécanismes, l'ATP est libéré dans l'espace extracellulaire où cette molécule sera le facteur déclenchant de la voie de signalisation purinergique, soit en activant directement ses récepteurs spécifiques, soit en étant dégradé par les ectonucléotidases présents à la surface cellulaire.

## **B. Les acteurs de la voie de signalisation purinergique**

Une fois l'ATP dans l'espace extracellulaire, il va subir une série de dégradation/réaction/transformation allant jusqu'à la formation d'acide urique sécrété par le rein. Les différents acteurs impliqués dans la production et le recyclage de ses dérivés purinergiques, ainsi que dans leur reconnaissance par la cellule constituent **la voie de signalisation purinergique (figure 4)**. Nous avons choisi de séparer cette voie de signalisation en deux parties : la première partant de l'ATP et allant jusqu'à l'AMP, et la seconde centrée sur l'adénosine que nous avons appelée « la voie de signalisation de l'adénosine ».

### **1. De l'ATP à l'AMP**

#### **a) *Les ectonucléotidases hydrolysant l'ATP***

Le devenir des purines dans l'espace extracellulaire met en jeu des ectonucléotidases qui vont déphosphoryler l'ATP et ses dérivés, jusqu'à produire de l'adénosine. L'ATP peut être déphosphorylé séquentiellement en ADP puis AMP grâce aux ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolases (ENTPDases) et aux phosphatases alcalines et acides (PAs), ou peut être directement dégradé en AMP via les ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (ENPPs) et l'ENTPDase1 (**figure 4**). L'enzyme ENPP2 ou autotaxine peut également produire de l'adénosine. Cette partie de la voie de signalisation purinergique est déjà bien décrite dans la littérature [23-25]. Les phosphatases alcalines et acides pouvant également produire de l'adénosine seront détaillées dans la partie B-2-b-2, dédiée à la voie de signalisation de l'adénosine.

#### **(1) Les ENTPDases**

Les ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolases sont nucléotides-spécifiques et hydrolysent les nucléosides triphosphates (NTP), par l'intermédiaire de nucléosides diphosphates (NDP), pour produire les nucléosides monophosphates (NMP) associés à pH physiologique [24]. La réaction catalytique globale est la suivante :  $\text{NTP} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NMP} + 2\text{P}_i$ . Chez l'homme, huit protéines ENTPDase paralogues ont été identifiées, mais seuls les membres 1-3 et 8 sont localisés à la surface cellulaire et hydrolysent l'ATP [23].





La spécificité de substrats de ces quatre membres est différente [24]. Chacune de ces enzymes peut hydrolyser l'ATP successivement en ADP puis en AMP avec un ratio qui lui est propre. La protéine ENTPDase1 peut hydrolyser l'ATP et l'ADP de manière égale (ratio ATP:ADP de 1:1), alors que l'enzyme ENTPDase2 possède une forte préférence pour l'ATP (ratio 30:1) [26]. Les enzymes ENTPDases3 et 8 présentent des ratios intermédiaires (respectivement 3:1 et 2:1) [27, 28]. De plus, seule l'ENTPDase1 peut également hydrolyser l'ATP en AMP sans produit intermédiaire [24].

Chaque ENTPDase possède un profil d'expression spécifique, mais ces enzymes sont globalement présentes dans tous les tissus [23]. Le rôle de ces ectonucléotidases est de réguler la concentration en nucléosides afin de moduler les nombreuses fonctions *via* les récepteurs P2. Par exemple, les fonctions de l'ENTPDase1, aussi connue sous le nom de CD39, sont relativement bien documentées. Cette ectonucléotidase est impliquée dans l'angiogenèse [29, 30], l'inflammation [31] et les réponses immunes [32].

## (2) Les ENPPs

Les ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterases hydrolysent les NTP (et parfois les NDP) pour produire les NMP associés selon la réaction suivante:  $NTP + 2H_2O \rightarrow NMP + 2P_i$  [24]. Cependant, à la différence des ENTPDase, les membres de la famille ENPP sont capables d'hydrolyser également d'autres substrats comme les dinucleosides polyphosphates, ADP ribose,  $NAD^+$  ou encore des phospholipides.

Cette famille multigénique comporte sept membres chez les mammifères, nommés ENPP1 à 7 selon leur ordre de découverte, mais seulement les enzymes ENPP1 à 3 sont capables d'hydrolyser les nucléotides [25]. Ces dernières sont des glycoprotéines transmembranaires dont le site catalytique est hautement conservé et leur expression recouvre quasiment tous les tissus.

Ces ecto-nucléotidases, en plus de moduler la voie de signalisation purinergique [25], sont impliquées dans la régulation de la minéralisation des os et du cartilage (principalement ENPP1), dans le recyclage des nucléotides et jouent également un rôle dans la motilité et l'invasion des cellules tumorales [33].

L'enzyme ENPP2 ou autotaxine est la plus étudiée car elle intervient également dans le métabolisme des lipides, et permet la production du médiateur lipide « lysophosphatidic acid » (LPA) à partir de la lysophosphatidylcholine (LPC) et autres lysophospholipides [34]. Le produit LPA intervient dans la signalisation des récepteurs à protéine G en stimulant la migration, la prolifération et la survie cellulaire.



## b) *Les enzymes reverses*

Il existe également des enzymes, appelées ici « reverses », permettant la phosphorylation des purines (**figure 4**). Une nouvelle molécule d'ATP peut être produite à partir d'un ADP grâce aux NDP Kinases qui vont lui transférer un phosphate d'un nucléoside triphosphate (NTP) ou bien grâce à l'ATP synthase. L'adenylate kinase permet de produire deux ADP, par transfert d'un phosphate d'un ATP sur un AMP.

### (1) Les NDP Kinases

Les protéines NDP Kinases permettent la production d'ATP par le transfert d'un phosphate d'un NTP sur un ADP, selon la réaction enzymatique suivante :  $\text{ADP} + \text{NTP} \rightarrow \text{ATP} + \text{NDP}$  [35]. Ces enzymes ubiquitaires sont principalement exprimées dans le cytoplasme, mais également à la surface cellulaire [36]. Elles possèdent une large spécificité de substrats parmi les purines et pyrimidines [35]. Les NDPKs sont des protéines homo- ou hétérohexamériques. Chez l'homme, il existe huit gènes codant pour les monomères NDPKs, nommés *NM23-H1 à 8* ou *NME1 à 8*. En régulant la balance cellulaire en ATP, les enzymes NDPKs sont caractérisées de protéines multifonctionnelles [37]. Ces kinases jouent un rôle notamment au niveau de la régulation du développement [38], de la signalisation cellulaire [39], du trafic membranaire [40] et de la tumorigenèse [41].

### (2) L'ATP synthase

L'enzyme ATP synthase produit de l'ATP à partir de l'ADP et d'un phosphate inorganique, selon la réaction catalytique suivante :  $\text{ADP} + \text{P}_i + \text{H}^+ \rightarrow \text{ATP} + \text{H}_2\text{O}$  [35]. Elle utilise la force électrochimique à la membrane mitochondriale et est impliquée dans le métabolisme énergétique. Elle est composée d'une partie  $F_0$  transmembranaire et responsable de la translocation des protons et d'une partie  $F_1$  dans la matrice mitochondriale [42]. Cependant, une ecto-ATP synthase a également été décrite à la surface des cellules endothéliales [43], adipocytes [44], kératinocytes [45] et divers tumeurs [46]. Elle est impliquée dans divers processus physio- et physiopathologiques comme la régulation du métabolisme des lipides et les réponses immunitaires [47], la neurotoxicité [48] ou encore la tumorigenèse [49].

### (3) L'adenylate kinase

L'enzyme adenylate kinase (AK) catalyse le transfert réversible d'un phosphate sur un AMP, à partir d'un ATP pour former 2 ADP ( $\text{AMP} + \text{ATP} \rightarrow 2\text{ADP}$ ) [35]. Il existe cinq isoformes d'adenylate kinase, mais seule la protéine AK1 $\beta$  est exprimée à la membrane plasmique [50]. AK1 $\beta$  est une protéine issue de l'épissage alternatif du gène *AKI*, l'adenylate kinase cytosolique la plus exprimée à travers les tissus. L'ectoenzyme AK1 $\beta$  est exprimée dans divers tissus, où son activité suggère un rôle au niveau de la voie de signalisation purinergique. C'est le cas dans le cerveau [51], les poumons [52], ou encore au niveau des cellules endothéliales et immunitaires [53].

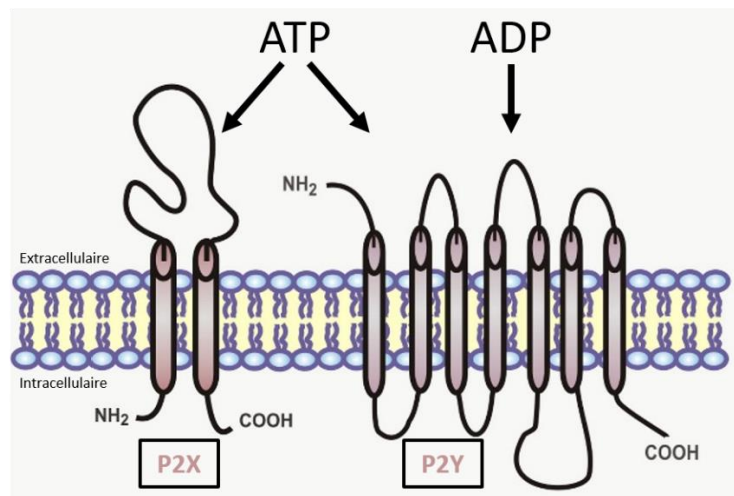


Figure 5 : Représentation schématique des récepteurs P2. D'après [35].

Agoniste	Récepteurs
ATP	P2X <sub>1-7</sub> , P2Y <sub>1</sub> P2Y <sub>2</sub> P2Y <sub>4</sub> P2Y <sub>6</sub> , P2Y <sub>11</sub> , P2Y <sub>12</sub> , P2Y <sub>13</sub>
ADP	P2Y <sub>1</sub> , P2Y <sub>12</sub> , P2Y <sub>13</sub>
UTP	P2Y <sub>2</sub> , P2Y <sub>4</sub> , P2Y <sub>6</sub>
UDP	P2Y <sub>6</sub> , P2Y <sub>14</sub>

Tableau 1 : Récepteurs P2 associés à leurs principaux agonistes naturels. D'après [54].

### c) *Les récepteurs P2*

Les molécules d'ATP et d'ADP peuvent être reconnues à la surface cellulaire par des récepteurs spécifiques appelés P2. Il existe deux familles: les P2X et les P2Y. L'ATP est reconnu par les deux sous-types, alors que l'ADP est uniquement reconnu par les P2Y (**figure 5**).

Les récepteurs P2X sont ionotropiques. Ils sont constitués d'homo- ou hétérotrimères formant un canal bidirectionnel [55]. Chez les mammifères, il existe sept sous-unités P2X, numérotées de 1 à 7 et codées par des gènes différents. Chacune possède deux domaines transmembranaires et un site de liaison extracellulaire à l'ATP, son unique ligand naturel (**figure 5** et **tableau 1**). Chaque récepteur possède son propre profil d'expression [1] et sa propre affinité pour différents agonistes et antagoniste (ATP et ses dérivés). Chacun présente également une sélectivité cationique différente ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{2+}$ ,  $\text{K}^{+}$ ).

Les récepteurs P2Y sont, quant à eux, métabotropiques, à sept domaines transmembranaires (**figure 5**). Ils peuvent reconnaître les purines ATP et ADP et/ou les pyrimidines UTP et UDP (**tableau 1**). Ils sont monomériques, mais peuvent s'oligomériser. Chez les mammifères, il existe huit récepteurs différents, nommés P2Y<sub>1</sub>, 2, 4, 6, et 11 à 14. Les chiffres manquants correspondent aux orthologues non-mammifères [54]. Comme pour les P2X, chaque récepteur P2Y possède un profil d'expression différent [1] et également ses propres spécificités d'agonistes et antagonistes [56]. Ils sont couplés aux protéines G et peuvent mobiliser différentes protéines G selon le substrat [54].

L'activation de ces différents récepteurs entraîne de nombreuses réponses cellulaires [57]. Par exemple, certains jouent des rôles antagonistes dans le cancer : P2Y<sub>1</sub> et P2Y<sub>2</sub> activent la prolifération de certains cancers, alors que P2X<sub>5</sub> et P2X<sub>7</sub> ont des propriétés anti-prolifératives [58]. Ces récepteurs apparaissent avec un potentiel clinique à explorer, non seulement dans les thérapies anti-cancéreuses, mais également dans les désordres du système nerveux [59, 60], cardiovasculaires [61, 62], ou encore dans les pathologies telles que l'ostéoporose [63] ou le diabète [57].

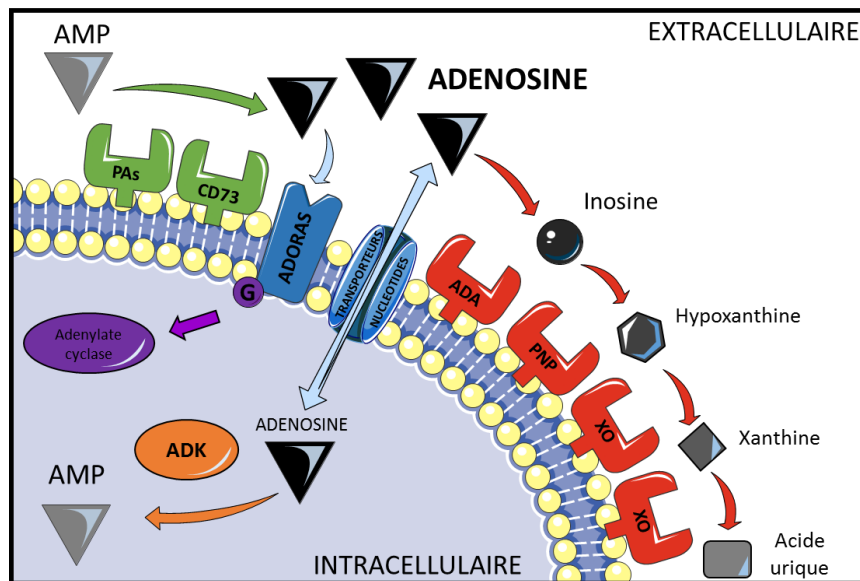


Figure 6: **Représentation de la voie de signalisation de l'adénosine** incluant les ectonucléotidases permettant sa production (en vert), les enzymes de dégradation de l'adénosine (extracellulaire en rouge et intracellulaire en orange), et les récepteurs ADORA et transporteurs de nucléotides spécifiques à l'adénosine (en bleu). La protéine adénylate cyclase (en violet) est associée aux protéines G des récepteurs ADORA. ADA: adénosine déaminase; ADK: adénosine kinase; CD73: ecto-5'-nucléotidase; PAs : phosphatases alcalines et acides ; PNP: purine nucleoside phosphorylase ; XO: xanthine oxydase.

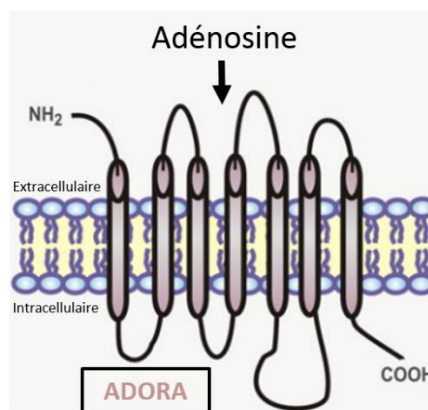


Figure 7: **Représentation schématique des récepteurs ADORA ou P1.** D'après [35].

## 2. Les acteurs de la voie de signalisation de l'adénosine

Ma thèse s'est portée sur le rôle de l'adénosine, molécule centrale de la seconde partie de la voie de signalisation purinergique (**figure 6**).

A la surface de la cellule, il existe des récepteurs spécifiques de l'adénosine (les récepteurs P1), dont l'activation va entraîner une cascade de signalisation cellulaire. L'adénosine présente dans l'espace extracellulaire peut être issue soit des dégradations successives de l'ATP, ADP et AMP extracellulaires grâce à l'action des ectonucléotidases, soit être libérée de la cellule *via* des transporteurs spécifiques ou relâchée après lyse cellulaire. L'adénosine peut être finalement dégradée soit par des enzymes de dégradation extracellulaires, soit phosphorylée en AMP, après recyclage à l'intérieur de la cellule par l'intermédiaire des transporteurs.

### a) *Les récepteurs P1 ou ADORA*

Les récepteurs P1, par opposition aux récepteurs P2 décrits plus haut, sont spécifiques de l'adénosine (**figure 7**). Ils sont également appelés ADORA (ou A) pour « adenosine receptors ». Au total, quatre sous-types ont été identifiés et clonés chez les mammifères : ADORA1, ADORA2a, ADORA2b et ADORA3 [64, 65]. Les détails physiologiques associés à l'activation des récepteurs ADORA seront exposés dans la partie II.

#### (1) Structure

Les récepteurs ADORA appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G et plus précisément aux protéines rhodopsine-like. Ils sont composés de sept domaines transmembranaires (TM) formés par des hélices- $\alpha$  hydrophobes et reliés entre eux par des boucles hydrophiles : trois extracellulaires et trois intracellulaires [66] (**figure 7**). La partie N-terminale se trouve dans l'espace extracellulaire, alors que l'extrémité C-terminale est cytoplasmique.

Pendant de longues années, les études structurales des récepteurs ADORA étaient basées sur la structure connue de la rhodopsine et sur des interprétations d'expériences de mutagenèses dirigées [67]. Ce n'est que récemment que les premières structures du récepteur humain ADORA2a ont été obtenues par cristallographie à rayon-X: couplé à un antagoniste (ZM241385) en 2008 [68], puis aux ligands naturels adénosine et caféine (antagoniste) en 2011 [69]. Ces différentes structures cristallographiques révèlent une orientation verticale du ligand dans le site de liaison du récepteur par rapport au plan de la membrane (**figure 8A**). La partie ribose des agonistes se lie dans la région hydrophile des domaines TM 3 et 7 et la partie adénine dans la zone hydrophobe entourée par les domaines TM 5 et 6 (**figure 8B**). De plus, les acide-aminés de la deuxième boucle extracellulaire (ECL2) permettraient l'ancrage du ligand. Les résidus peu conservés sont situés dans la partie



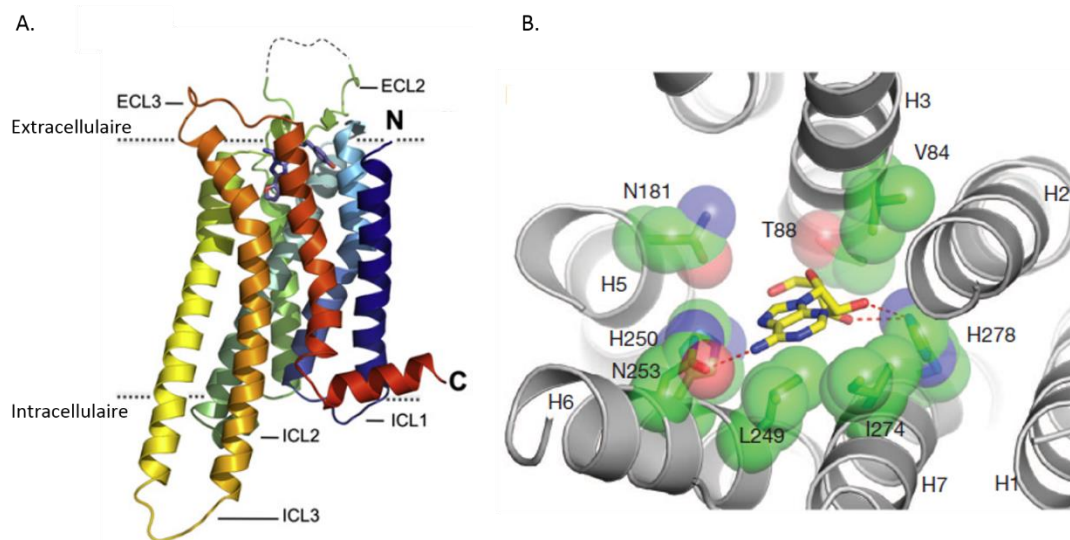


Figure 8: **Structure du récepteur ADORA2a humain.** **A. Récepteur ADORA2a entier couplé à l'antagoniste ZM241385.** Les domaines transmembranaires (TM) sont représentés en hélices- $\alpha$  de couleurs allant du bleu foncé au rouge (TM1 à TM7). Les boucles extracellulaires (ECL pour ExtraCellular Loop) et intracellulaires (ICL pour IntraCellular Loop) sont numérotées dans le même ordre que les domaines TMs. L'antagoniste ZM241385 est représenté en bâtonnet bleus foncés. D'après [69]. **B. Liaison du récepteur ADORA2a à l'adénosine vue de la surface extracellulaire.** L'adénosine est représentée en bâtonnets jaunes (carbone), bleus (azote) et rouges (oxygène). Les hélices- $\alpha$  (H) composant les domaines transmembranaires sont représentés en gris (H1, H2, H3, H5, H6, H7) et les boules vertes (carbone), bleues (azote) et rouges (oxygène) correspondent à la composition chimique des résidus impliqués dans la liaison à l'adénosine. Les noms des acides aminés sont donnés à titre indicatif. Les acides aminés représentés se situent sur les domaines transmembranaires comme suit : valine 84 (V84) et thréonine 88 (T88) associés à H3, asparagine 181 (N181) associé à H5, leucine 249 (L249), asparagine 253 (N253), histidine 250 (H250) associés à H6 et isoleucine 274 (I274) et histidine 278 (H278) associés à H7. D'après [66].

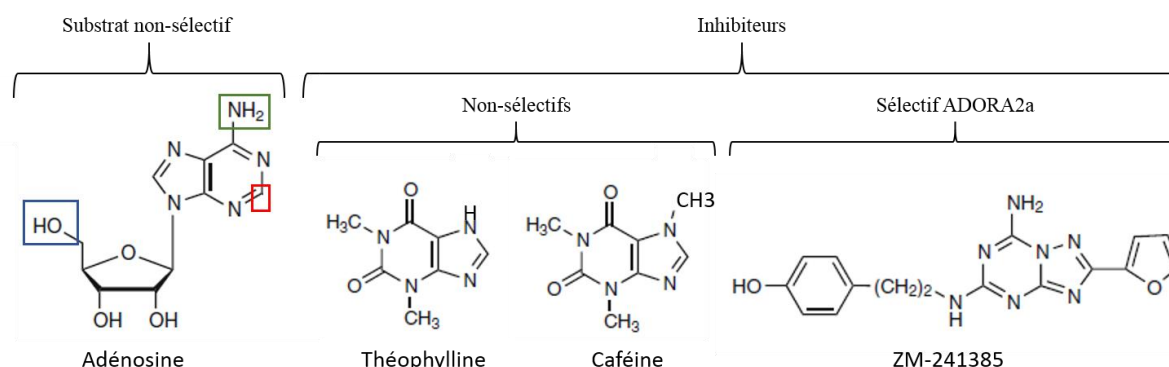


Figure 9: **Structure chimique des substrats des récepteurs ADORA.** Les modifications chimiques par rapport à la molécule d'adénosine trouvées dans les agonistes sont encadrées en bleu (5' du ribose), rouge (C<sup>2</sup> du cycle adénine) et vert (N<sup>6</sup> du cycle adénine). D'après [56].

extracellulaire de la cavité de liaison et seraient responsables des variations importantes de sélectivité de ligands pour chaque récepteur. Le site de liaison exacte des protéines G n'est pas encore disponible, mais il semblerait que celles-ci se fixent au récepteur au niveau de la troisième boucle intracellulaire (ICL3).

Les pourcentages d'homologie des protéines ADORA entières, entre elles et entre les différentes espèces sont relativement faibles (aux alentours de 47%). Le récepteur ADORA3 est le plus divergeant des trois autres récepteurs [56]. Cependant, les résidus impliqués dans le recrutement du ligand sont très conservés entre les sous-types ADORA et entre les espèces.

## (2) Substrats

L'adénosine est le substrat naturel des quatre récepteurs ADORA (**figure 9**). A l'inverse, les méthylxanthines comme la caféine ou la théophylline sont des antagonistes naturels non-sélectifs. Cependant, dans un but thérapeutique, de nombreux agonistes et antagonistes sélectifs d'un ou plusieurs récepteurs ADORA ont été synthétisés. En effet, depuis 2000, une banque regroupant une multitude d'agonistes et d'antagonistes prédits *in silico* à partir de la structure du récepteur ADORA2a est disponible. Certains sont déjà utilisés comme traitement clinique (<http://clinicaltrials.gov>) et seront présentés dans la partie II. Les agonistes des récepteurs ADORA sont dérivés de l'adénosine avec des structures très proches [70]. Les modifications chimiques par rapport à la molécule d'adénosine se trouvent en position 5' du ribose, ou encore en N<sup>6</sup> et C<sup>2</sup> du cycle adénine (**figure 9**). Les antagonistes, quant à eux, sont dérivés de la xanthine. La structure de l'antagoniste ZM241385, utilisé pour la cristallisation du récepteur ADORA2a [68] est présentée dans la **figure 9**.

## (3) Mécanismes

### (a) Protéines G

Les récepteurs ADORA appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Les voies de signalisation engendrées par l'activation de ces récepteurs sont complexes et ne sont pas toutes connues. Cependant, les propriétés mécanistiques les plus décrites sont présentées ci-dessous et dans la **figure 10** [71].

ADORA1 et ADORA3 sont couplés aux protéines G<sub>i</sub>, alors que les deux récepteurs ADORA2a et 2b sont couplés aux protéines G<sub>s</sub>. Après activation des récepteurs, la sous-unité  $\alpha$  des protéines G va inhiber pour G<sub>i</sub> ou stimuler pour G<sub>s</sub> l'adénylate cyclase, modulant ainsi sa production d'AMPc intracellulaire à partir de l'ATP. Le rôle de l'AMPc est d'activer des protéines kinases (PK) qui vont à leur tour phosphoryler des protéines cibles (cAMP response element binding ou CREB). La protéine kinase la plus notable est la PKA qui va phosphoryler des canaux ioniques afin de permettre l'entrée du calcium extracellulaire. Les quatre récepteurs ADORA peuvent dans certains cas être couplés à la

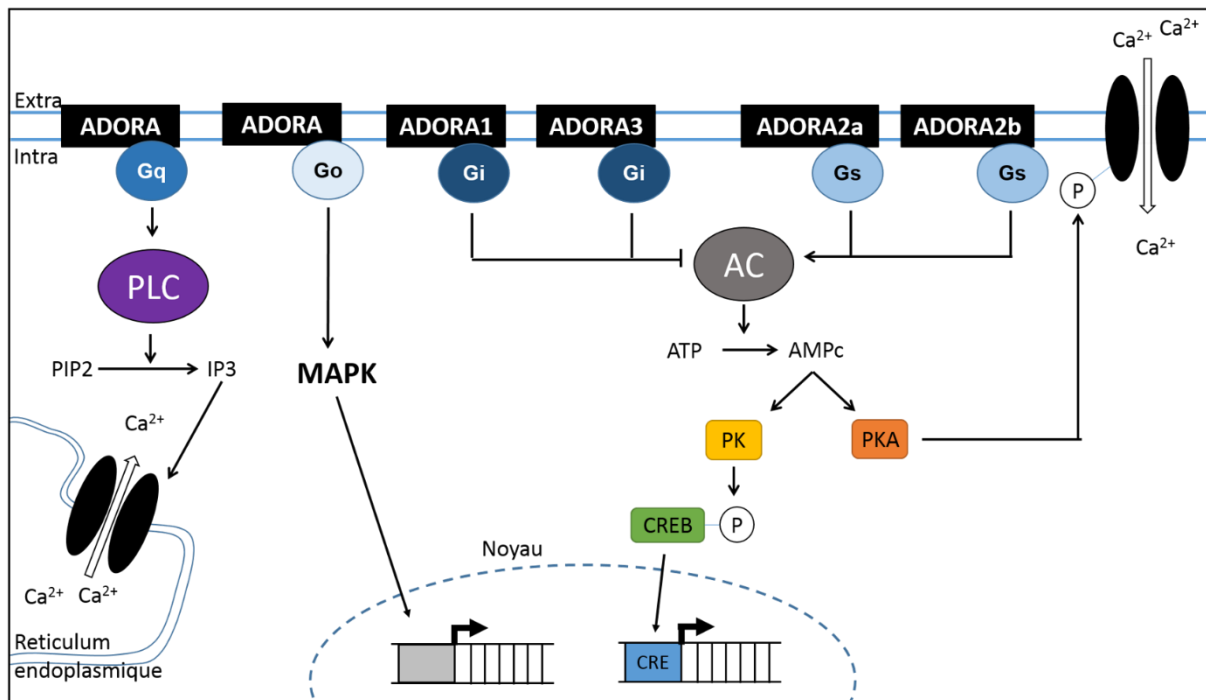


Figure 10: **Représentation schématique des réponses cellulaires associées à chaque récepteur ADORA.** Les récepteurs ADORA sont couplés aux protéines Gq, Go, Gi et Gs et vont intervenir dans la voie des MAP Kinases (MAPK), activer la phospholipase C (PLC) ou activer ou inhiber l'adénylate cyclase (AC). CREB: cAMP response element binding; IP<sub>3</sub>: inositol triphosphate; PIP<sub>2</sub>: phosphatidylinositol-4,5-diphosphate; PKA: protéine kinase A. D'après [71].

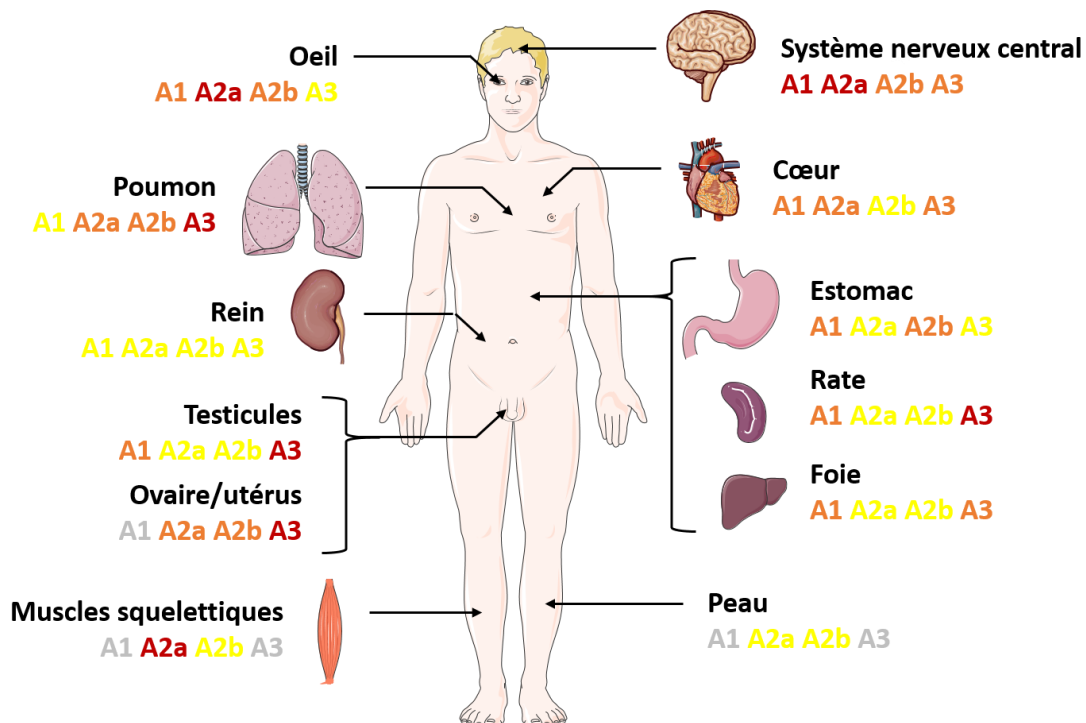


Figure 11: **Expression des récepteurs ADORA (A) chez l'adulte.** Le niveau d'expression de chaque récepteur dans les différents organes est représenté par un code couleur : fort en rouge, moyen en orange, faible en jaune et nul en gris. Ce schéma est basé sur les résultats obtenus chez l'homme, le rat, la souris et le cochon. Références dans le texte.

protéine  $G_q$  dont la sous-unité  $\alpha$  entraîne l'activation de la phospholipase C, permettant le clivage du  $PIP_2$  (phosphatidylinositol-4,5-diphosphate) en  $IP_3$  (inositol triphosphate). Ce dernier va entraîner l'ouverture des canaux calciques présents au niveau du réticulum endoplasmique et la libération du calcium stocké. Les récepteurs ADORA peuvent également stimuler la voie des MAPK via la sous-unité  $\alpha$  de la protéine  $G_0$  ou les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  des protéines G associées.

#### (b) Dimérisation

Les récepteurs ADORA peuvent former des homodimères, mais également des hétérodimères, entre eux, avec les récepteurs P2Y ou avec d'autres protéines. Les conséquences de ces dimérisations sur la signalisation cellulaire restent encore peu comprises [72].

#### (4) Distribution

La plupart du temps, plus d'un récepteur ADORA est exprimé dans un seul type cellulaire. Ceci suggère qu'il existe une redondance fonctionnelle entre ces différents récepteurs et montre l'importance de ces récepteurs chez l'adulte. En 1996, la seule étude comparative de l'expression des quatre récepteurs ADORA a été effectuée par RT-PCR chez le rat adulte [73]. Elle confirme les profils d'expression obtenus précédemment pour chaque récepteur chez l'homme [74, 75], la souris et le cochon [76]. Ces résultats peuvent être extrapolés à l'homme et sont résumés dans la **figure 11**.

#### b) *Enzymes de production*

Les **ectonucléotidases** présentes à la surface cellulaire déphosphorylent les dérivés phosphates de l'ATP dans l'espace extracellulaire, pour ainsi produire de l'adénosine.

##### (1) Ecto-5'-nucléotidase - CD73

Parmi les sept 5'-nucléotidases présentes chez l'homme, six sont intracellulaires (cinq cytosoliques et une mitochondriale), et une seule est présente à la surface cellulaire [35]. Cette dernière est appelée ecto-5'-nucleotidase ou CD73 et est codée par le gène *NT5E*. Elle appartient à la superfamille des métallophosphoestérase.

##### (a) *Substrats*

L'enzyme CD73 est capable d'hydrolyser les ribo- et deoxyribonucléosides 5'-monophosphates comme l'AMP, CMP, UMP, IMP et la GMP, mais son activité d'hydrolyse du 5'-AMP en adénosine est la plus importante avec un  $K_m$  de 3 à 50  $\mu M$  [24]. La réaction catalytique globale est la suivante :  $NMP + H_2O \rightarrow N + P_i$ .

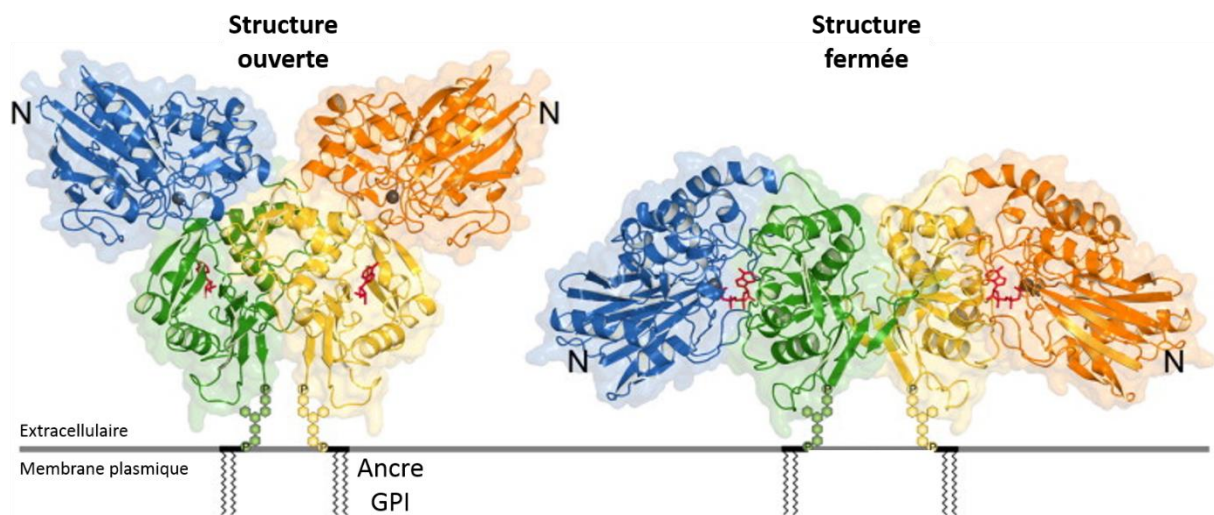


Figure 12: **Structures de la CD73 humaine, dans des conformations ouverte et fermée.** Les domaines N- et C-terminal des deux sous-unités sont représentés en bleu/orange et vert/jaune, respectivement. Les ligands sont représentés en bâtonnets rouges (adénosine et AMPCP pour la conformation ouverte et fermée, respectivement). Les boules grises représentent les ions métalliques. D'après [77].

L'ATP et ADP sont des inhibiteurs compétitifs, qui vont se lier au site catalytique sans être hydrolysés, permettant ainsi un rétrocontrôle négatif. Il existe également d'autres inhibiteurs comme l'AMPCP, un dérivé de l'ADP qui ne peut être hydrolysé et qui a été utilisé pour la cristallisation de la protéine CD73 humaine [77].

### (b) *Structure*

Chez les mammifères, cette enzyme est composée de deux sous-unités glycoprotéiques (60-70 kDa) reliées par des liaisons non covalentes [78]. Chaque monomère est fixé à la membrane plasmique par une ancre GPI en C-terminal. Ce domaine contient également le site de liaison aux substrats. La liaison aux ions métalliques, comme le zinc, se fait au niveau du domaine N-terminal.

Depuis longtemps, les études structurales de l'enzyme eucaryote étaient basées sur la similarité de séquences primaires avec la protéine bactérienne, dont la structure était connue [79]. En 2012, la structure de la protéine CD73 humaine a été déterminée par cristallographie au rayon-X, selon deux conformations: une ouverte, couplée à l'adénosine et une fermée, couplée à un AMP non hydrolysable (AMPCP) [77] (**figure 12**). Les domaines N- et C-terminal de chaque sous-unité sont reliés entre eux par une hélice  $\alpha$  pouvant supporter une rotation de  $114^\circ$  et permettant le passage entre les deux conformations.

Les 5'-ectonucléotidases cytosoliques sont tétramériques et ne sont pas apparentées structurellement à la CD73 [80]. Ces enzymes, bien que possédant une activité 5'-ectonucléotidase, appartiennent à la famille des déhalogénases haloacides.

### (c) *Mécanisme catalytique*

Le site actif est présent dans la conformation fermée et se situe à l'interface entre les deux domaines N- et C- terminal [24]. En effet, cette conformation permet le rapprochement entre les sites de liaison au substrat et aux ions métalliques. Les résidus catalytiques du site actif sont très conservés entre les protéines bactérienne et humaine.

De par les observations des différentes conformations des enzymes de différentes espèces étudiées [77], une hypothèse décrivant le mécanisme catalytique de la protéine CD73 est retenue. Tout d'abord, la partie adénosine du substrat est reconnue par le site de liaison au substrat, dans la conformation ouverte. Elle est stabilisée dans la poche de liaison par des interactions hydrophobes. Puis, après changement de conformation, les ions métalliques se fixent au groupe phosphate du substrat par des liaisons hydrogènes, entraînant une attaque nucléophile. Enfin, l'adénosine néo-formée est libérée après retour à la conformation ouverte.



La protéine peut également se trouver sous forme soluble dans l'espace extracellulaire [81], suite à un clivage au niveau de l'ancre GPI [82] et peut alors avoir une activité 5'-nucléotidase à distance des sites d'expression de la forme membranaire.

#### (d) Distribution

En conditions physiologiques, la protéine est exprimée à la surface d'un large panel de tissus, mais pas dans tous les types cellulaires. Chez les mammifères, son expression est forte au niveau du rein, du cerveau [78], du foie, du cœur, des poumons et des testicules [83]. Le gène *NT5E* est aussi exprimé dans certains sous-types de lymphocytes T et B. Ce gène est un marqueur des lymphocytes matures. Cependant, il n'est pas ou peu exprimé dans les neutrophiles, érythrocytes, plaquettes et autres cellules sanguines. Son expression est également trouvée au niveau des cellules endothéliales des larges vaisseaux [84] et des cellules musculaires. De plus, ce gène est surexprimé dans de nombreux types de cancer [85] comme les leucémies, mélanomes, glioblastomes ou encore les cancers du sein, des ovaires, de la thyroïde et de la prostate.

#### (e) Rôles non-enzymatiques

L'ectoenzyme CD73 régule essentiellement la voie de signalisation purinergique, notamment au niveau du rein et de l'immunité (voir II- rôle de l'adénosine). Cependant, d'autres fonctions non enzymatiques ont été proposées, comme l'induction de signalisations intracellulaires. En effet, à la surface des lymphocytes T, la protéine CD73 reconnaît un CD73-ligand présent à la surface des cellules présentatrices d'antigène [86]. Cette enzyme serait une molécule de co-stimulation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Cette hypothèse a été démontrée en 1997 par la stimulation des lymphocytes T grâce à des anticorps anti-CD73, mais à ce jour, aucun CD73-ligand n'a été identifié. La protéine CD73 permet également la médiation de l'adhésion cellule-cellule ou cellule-matrice extra-cellulaire. En effet, l'utilisation d'anticorps anti-CD73 a permis de démontrer son implication dans la liaison des lymphocytes aux cellules endothéliales [87, 88], ou dans l'adhésion entre les lymphocytes B et les cellules dendritiques folliculaires [89]. La liaison de la protéine CD73 aux protéines de la matrice extra-cellulaire comme la laminine [90], la fibronectine [91] ou encore la tenascine C a aussi été démontrée et est impliquée dans la migration et l'invasion cellulaire [85].



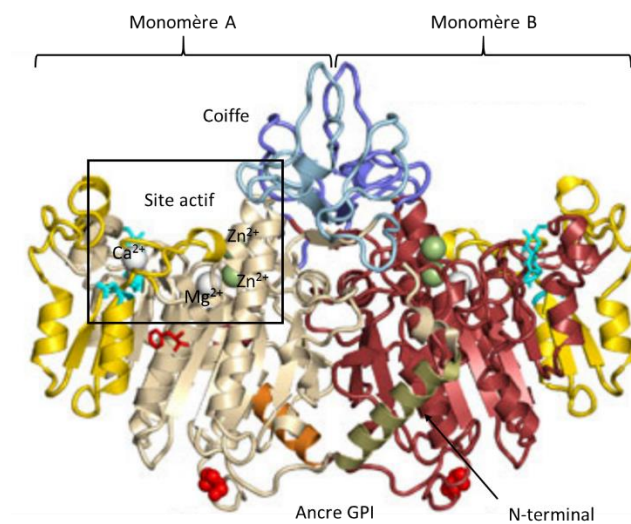


Figure 13: **Structure de l'enzyme PLAP humaine.** Le monomère A est représenté en beige, et le monomère B en rouge. Les domaines « coiffe » sont en bleu clair (monomère A) et bleu foncé (monomère B). Les domaines de liaison au métal sont représentés en jaune. Le site actif du monomère A est encadré en noir. Les hélices  $\alpha$  en N-terminal stabilisant le dimère sont représentées en vert (monomère A) et en orange (monomère B). Les ions  $\text{Zn}^{2+}$  des sites actifs sont en vert et les ions  $\text{Mg}^{2+}$  en blanc. Les sites de glycosylation sont en bâtonnets de couleur bleu turquoise et les résidus des parties C-terminale en sphère rouge. Le site de liaison au ligand (L-phénylalanine) est représenté en bâtonnet rouges. D'après [24].

## (2) Phosphatases

Les phosphatases alcalines et acides sont impliquées dans le métabolisme de l'adénosine.

### (a) *alcalines*

Les phosphatases alcalines (AP) catalysent des réactions de transfert phosphoryl à la surface cellulaire à pH basique et permettent notamment de déphosphoryler séquentiellement l'ATP en ADP, AMP, puis en adénosine. Il existe quatre enzymes différentes chez l'homme nommées selon leur spécificité d'expression: intestinale (IAP codée par le gène *ALPI*), placentaire (PLAP codée par le gène *ALPP*), cellule germinale (GCAP codée par *ALPPL2*) et tissu-non spécifique (TNAP codée par le gène *ALPL*). Les trois premières AP présentent entre 90 à 98% d'homologie les unes avec les autres, alors que la TNAP possède seulement entre 50% et 60% d'homologie avec les trois autres protéines.

#### (i) *Structure*

Les informations structurales ont longtemps été basées sur la structure connue de l'AP bactérienne et sur des prédictions à partir des séquences protéiques de chacune [92]. La première structure tridimensionnelle d'une phosphatase alcaline mammifère, la protéine PLAP humaine a été obtenue en 2001 (**figure 13**) [93]. Cette structure a facilité le modelage des trois autres phosphatases alcalines humaines dont les fonctions sont conservées [94]. Les phosphatases alcalines mammifères sont des protéines homodimériques dont chaque sous-unité possède un poids moléculaire de 80kDa. Cependant, des hétérodimères sont possibles entre les trois enzymes IAP, GCAP et PLAP [94]. Par contre, les protéines ALPL ne peuvent s'hétérodimériser.

Chaque site catalytique contient trois ions métal nécessaires pour l'activité enzymatique (deux  $Zn^{2+}$  et un  $Mg^{2+}$ ) [95], un quatrième site de liaison métal non catalytique occupé par un ion  $Ca^{2+}$ , mais dont la fonction n'est pas encore déterminée [93, 95] et un site de liaison à un phosphate. Le domaine de liaison métal est composé d'un feuillet  $\beta$  flanqué de deux hélices  $\alpha$ . En tout, le cœur du monomère est composé de dix feuillets  $\beta$ , dont neuf sont parallèles, entourés d'hélices  $\alpha$ . Il contient des sites de N-glycosylation dont le nombre prédit varie selon l'enzyme, le tissu ou l'isoforme [96, 97]. Les AP possèdent également une hélice  $\alpha$  à son extrémité N-terminale impliquée dans la stabilisation du dimère [98], et un domaine « coiffe » proche de l'interface du dimère, composé de deux rangs de trois feuillets  $\beta$  parallèles, formant des interactions mutuelles entre les deux monomères. Ce dernier est nécessaire pour l'inhibition non-compétitive [99] et le comportement allostérique [100].

Les phosphatases alcalines humaines sont fixées à la membrane plasmique par une ancre GPI mais peuvent être relâchées par une phospholipase C bactérienne spécifique des phosphatidylinositol [101].

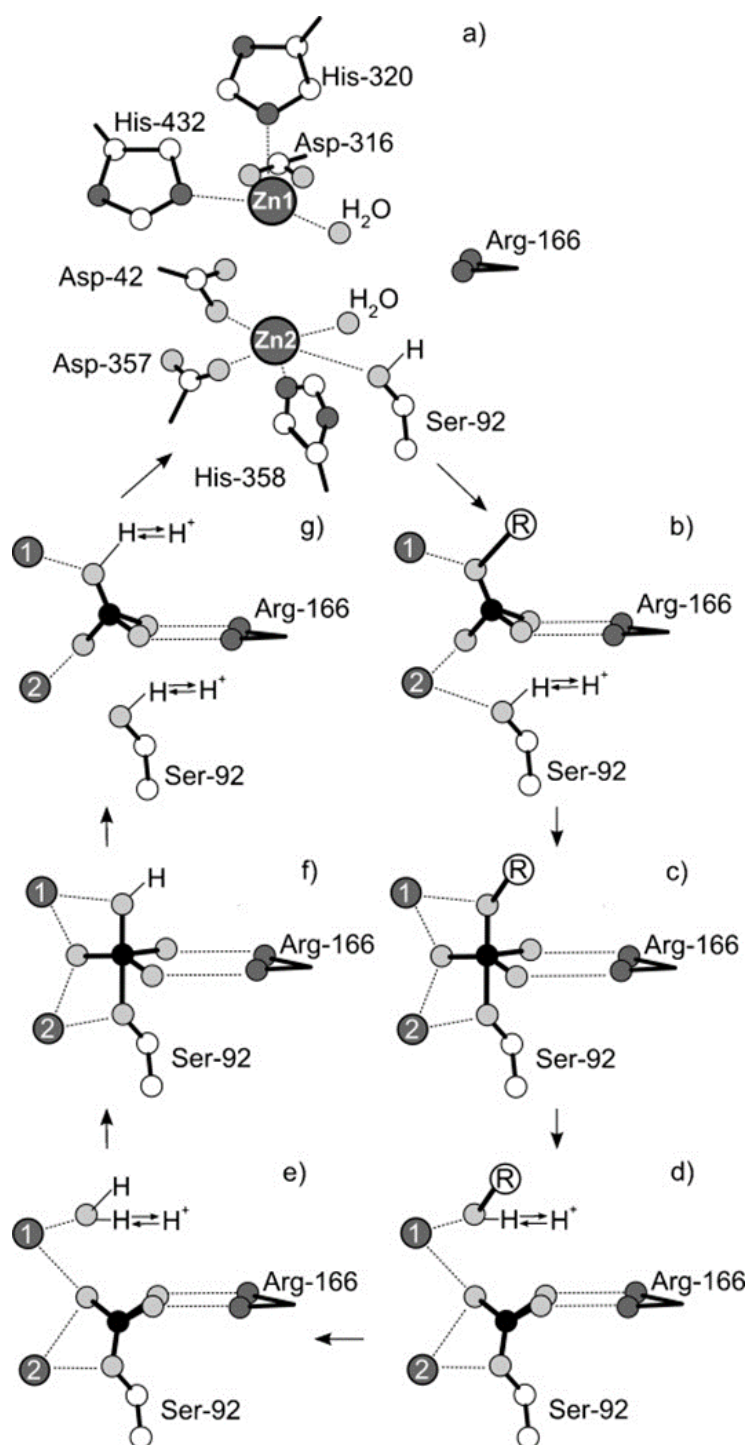


Figure 14: **Mécanisme catalytique proposé pour les phosphatases alcalines.** a) Schéma du site actif à l'état libre. b) Fixation du substrat. c) Etape de transition. d) Intermédiaire sérine phosphorylée. e) et f) formation du phosphate pentamérique. g) Déphosphorylation de la sérine intermédiaire. Les résidus indiqués sont numérotés sur la protéine PLAP humaine. D'après [24].

### (ii) Mécanisme catalytique

Le mécanisme réactionnel fonctionne via un intermédiaire covalent (**figure 14**) [102]. En effet, le résidu phosphate du substrat se lie au niveau des deux ions  $Zn^{2+}$  du site catalytique et va être transféré sur une sérine grâce à une molécule d' $H_2O$  (résidu S92 pour la protéine PLAP humaine). Cette première transition est stabilisée par un résidu arginine (R166) et les deux ions zinc. La structure de cette PLAP intermédiaire phosphorylée a été déterminée par cristallographie avec l'inhibiteur non compétitif L-Phénylalanine [103] (**figure 13**). La seconde partie du mécanisme est similaire à la formation de l'intermédiaire covalent. Cependant, le rôle des deux ions  $Zn^{2+}$  n'est plus le même. Une molécule d' $H_2O$  est transférée sur le résidu phosphate grâce à l'ion  $Zn^{2+}$  afin de former un pentaphosphate, stabilisé de la même manière que dans la première partie. Enfin, le phosphate inorganique va être libéré par formation d'une molécule d' $H_2O$  au niveau de la sérine. Le rôle de l'ion  $Mg^{2+}$  serait d'accepter le proton formé par la liaison du phosphate initial à la sérine [92].

### (iii) Substrats

Les phosphatases alcalines présentent un large panel de substrats. Ces enzymes sont capables d'hydrolyser ou de transphosphoryler une grande variété de composés phosphatés *in vitro* [95]. Cependant, seulement quelques-uns ont été confirmés comme étant des substrats naturels des APs.

La protéine TNAP est capable de cliver les pyrophosphates inorganiques (PPi) [104], le pyridoxal-5'-phosphate (PLP) [105], le monofluorophosphate [106], mais pas le polyphosphate inorganique (polyP) [107] (**figure 15**). Les enzymes IAP et la PLAP, quant à elles, hydrolysent les phosphatidates présentant de nombreuses chaînes d'acide gras [108] et le polyphosphate inorganique [107].

Les phosphatases alcalines sont impliquées dans le métabolisme des nucléotides en hydrolysant l'ATP, *via* l'ADP et l'AMP en adénosine [109], mais peuvent également hydrolyser de nombreux dérivés phosphate du glucose et du fructose [110]. Ces enzymes sont aussi capables de cliver l'endotoxine lipopolysaccharide (LPS) bactérienne [111]. De plus, le BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) est un substrat synthétique des phosphatases alcalines (**figure 15**). Il est utilisé en laboratoire pour révéler l'activité phosphatase alcaline car il est capable de réagir, une fois clivé, avec un autre composé, le NBT (nitro blue tetrazolium chloride), pour former un substrat coloré (voir matériel et méthode, article partie 2).

Le levamisol, couramment utilisé en laboratoire, est un inhibiteur non-compétitif des phosphatases alcalines, en bloquant l'hydrolyse de l'AMP (**figure 15**) [99].

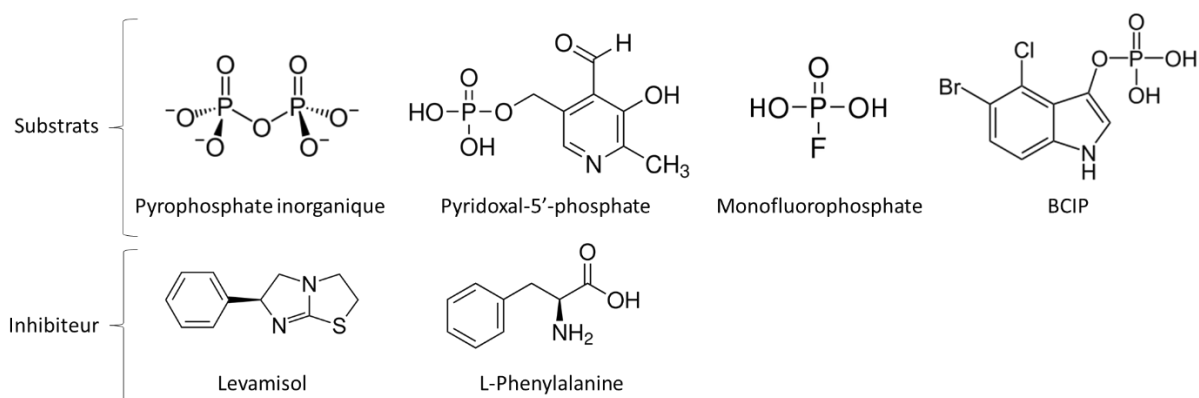


Figure 15: **Exemples de substrats et inhibiteurs de la phosphatase alcaline TNAP.**

#### (iv) Rôles

Chez l'homme, une déficience en TNAP entraîne une pathologie appelée hypophosphatasie, caractérisée par des défauts dans la minéralisation osseuse et dentaire, ainsi que, dans certains cas, des désordres neurologiques [112]. La fonction exacte de l'enzyme TNAP n'est pas encore claire, mais semble faire intervenir l'hydrolyse du PPi et de la PLP [113]. Une déficience en TNAP entraîne donc une accumulation du substrat PPi dans l'espace extracellulaire qui va inhiber la minéralisation ostéoblastique [114, 115]. De plus, une absence de clivage de la PLP en pyridoxine (vitamine B6) explique les attaques cérébrales chez certains patients [116, 117]. L'enzyme IAP joue un rôle de détoxification bactérienne de l'intestin par le clivage de LPS [118], de prévention de l'inflammation [119], maintien de l'homéostasie de la flore intestinale [120] et dans le transport des acide gras dans les entérocytes [121].

Comme la protéine CD73, les enzymes APs sont capables de se fixer aux composants de la matrice extracellulaire. La TNAP interagit avec le collagène qui joue un rôle dans la calcification du squelette, au niveau du domaine « coiffe » [122]. Cette propriété serait impliquée dans sa fonction de minéralisation osseuse [100, 123]. De plus, cette protéine peut se lier avec la portion Fc des IgG humaines, agissant comme un récepteur à IgG au niveau du placenta. De ce fait, la PLAP est impliquée dans l'internalisation et du transfert des IgG de la circulation maternelle à celle du fœtus durant la grossesse [124].

#### (v) Expression

Les phosphatases alcalines sont souvent exprimées aux surfaces d'échange comme les endothéliums, les bordures apicales des entérocytes [121], les tubules rénaux [125] ou les muqueuses pulmonaires [52]. Elles peuvent aussi être exprimées par les cellules souches embryonnaires [126], primordiales [127] et neurales [128]. Leur expression a été également retrouvée dans diverses tumeurs [129].

La TNAP est appelée « tissue non-specific AP », mais également « liver, bone, kidney AP » car chez les mammifères, le gène *ALPL* est fortement exprimée dans ces tissus. Les transcrits *ALPL* est aussi exprimée dans le système nerveux en formation [130, 131]. Chez l'homme, l'enzyme IAP est présente dans l'intestin, mais également dans le pancréas, le foie et le rein [132]. Les protéines PLAP et GCAP sont spécifiques de l'homme et sont exprimées respectivement dans le placenta et les tissus reproducteurs dans les cellules germinales [95]. Chez la souris, l'enzyme EAP pour « embryonic alkaline phosphatase » est exprimée uniquement dans les tissus embryonnaires et les testicules.

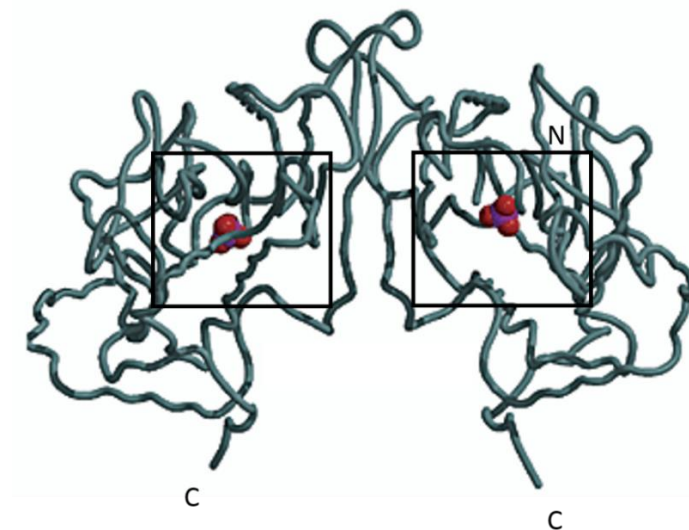


Figure 16: **Structure de la PACP humaine.** Le site actif de chaque monomère est encadré en noir. Les boules rouges et violettes représentent les ions phosphates. D'après [133].

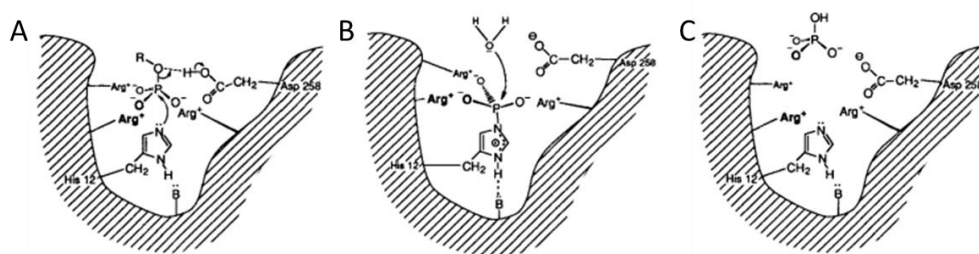


Figure 17: **Mécanisme catalytique des phosphatases acides.** (A) Formation de l'intermédiaire phosphohistidine et libération du produit. (B) Attaque nucléophile d'une molécule d' $H_2O$ . (C) Libération du phosphate inorganique. Arg : arginine ; Asp : asparagine et His : histidine. Les résidus sont numérotés sur la protéine PACP humaine. D'après [134].

### (b) *acide prostatique*

Les phosphatases acides (ACP) hydrolysent une large variété de petites molécules phosphomonoestères organiques en conditions acides. Il existe au moins 5 types de phosphatases acides chez l'homme, nommées selon leur spécificité d'expression [104]. C'est le cas par exemple de la protéine LACP pour Lysosomal Acid Phosphatase [135], ou encore de la protéine TACP pour Testicular Acid Phosphatase [136].

La plus étudiée est la phosphatase acide prostatique humaine ou PACP, codée par le gène *ACPP*. Elle peut être intracellulaire (cPACP) ou sécrétée (sPACP) [137]. Cependant il existe un variant transmembranaire (TM-PACP) ayant été récemment décrit récemment comme possédant une activité ectonucléotidase [138]. Ce variant qui est l'isoforme la plus longue (418 acides aminés versus 386 pour sPACP) est caractérisée par une extrémité C-terminale différente, contenant un domaine transmembranaire de type 1.

#### (i) *Substrats*

Classiquement, la phosphatase acide prostatique possède une très large spécificité parmi les phosphomonoestères [139]. Elle peut hydrolyser *in vitro* divers substrats, incluant l'acide lysophosphatidique (LPA), les phospho-acides aminés et les 5'-nucléotides [140]. En plus de ces propriétés, la TM-PACP est une ectonucléotidase et peut hydrolyser *in vivo* l'AMP extracellulaire en adénosine, plus faiblement l'ADP, mais pas l'ATP [138].

#### (ii) *Structure*

La protéine TM-PACP est une glycoprotéine transmembranaire, constituée de deux sous-unités de 50 kDa. Sa structure cristallographique n'est pas encore déterminée, contrairement à celle de l'isoforme sécrétée [141] (**figure 16**). Chaque sous-unité est composée d'un large domaine de type  $\alpha/\beta$  constitué d'un segment central de 7 feuillets  $\beta$ , flanqué de 2 hélices  $\alpha$  et d'un plus petit domaine contenant 6 hélices  $\alpha$  et une boucle. Le site actif se trouve entre ces deux domaines, où 8 liaisons hydrogènes fixent le phosphate du substrat [133]. Le domaine transmembranaire de la TM-PACP se trouve dans la continuité C-terminale [142].

#### (iii) *Mécanisme catalytique*

Le mécanisme catalytique de la PACP est différent de celui de la phosphatase alcaline (**figure 17**). Il a été déterminé par des études de mutagenèses dirigées [137]. Le phosphate du substrat se fixe dans le site actif par interaction avec les charges positives de trois résidus arginine (R11, R15 et R79 de la protéine humaine). Le phosphate subit alors une attaque nucléophile du cycle imidazole de l'histidine 12 et un proton va être transféré de l'asparagine 258 sur la partie libre du substrat.



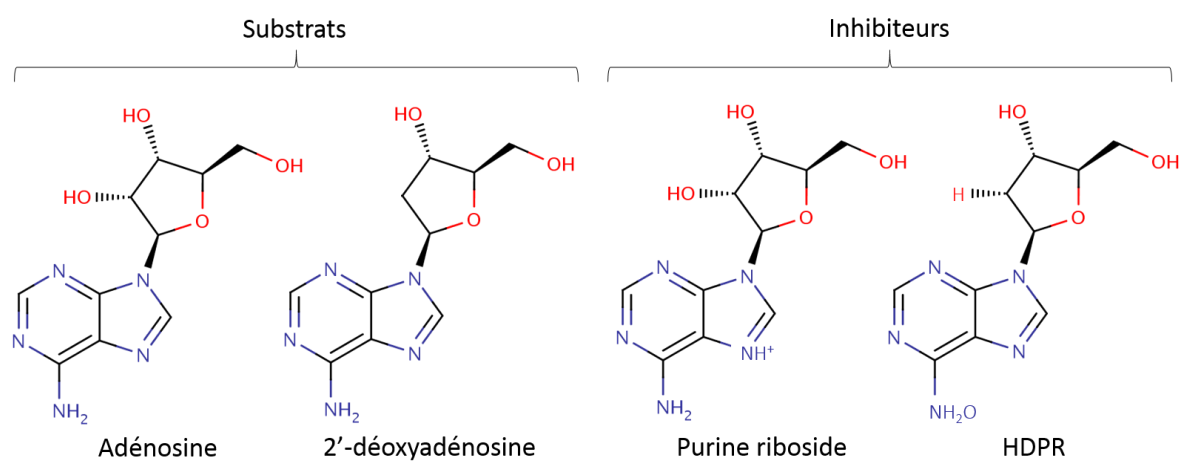


Figure 18: **Substrats et inhibiteurs de l'enzyme ADA.**

Cette première étape permet la formation d'un intermédiaire phosphohistidine, qui va subir par la suite une attaque nucléophile d'une molécule d'H<sub>2</sub>O. Cette deuxième étape permet la libération d'un phosphate inorganique.

#### (iv) *Rôle*

A travers le métabolisme de l'adénosine, la TM-PACP joue un rôle dans l'endo- et exocytose. Chez la souris, la perturbation de ce trafic membranaire est impliquée dans le développement du cancer de la prostate [142] et dans des perturbations de la neurotransmission GABAergique [143]. De plus, elle permet la réduction de la douleur [138].

#### (v) *Distribution*

Chez la souris, la protéine TM-PACP est présente dans les vésicules et membranes prostatiques, mais elle est également exprimée dans des tissus non-prostatiques, comme le cerveau, le rein, la thyroïde, les poumons et la rate [142].

### c) *Enzymes de dégradation*

L'adénosine extracellulaire formée par les ectonucléotidases peut être catalysée à la surface cellulaire, afin que ses produits d'hydrolyse puissent être ensuite sécrétés par le rein, ou peut entrer dans la cellule via des transporteurs spécifiques (voir I.B.2.d- Les transporteurs) pour être phosphorylée en AMP, puis être recyclée.

#### (1) Adénosine désaminase – ADA

L'adénosine désaminase (ADA) catalyse la réaction irréversible de déamination de l'adénosine en inosine [35], à l'aide du cofacteur métallique Zn<sup>2+</sup>, selon la réaction catalytique suivante : adénosine + H<sub>2</sub>O → inosine + NH<sub>3</sub>. Elle peut être cytosolique ou extracellulaire [144, 145]. Il existe également une enzyme nommée ADA2 avec une plus faible affinité pour l'adénosine. Une déficience en ADA chez l'homme et la souris entraîne la pathologie SCID pour « Severe Combined Immunodeficiency Disease » [146] (voir la partie II).

#### (a) *Substrats*

L'adénosine désaminase est capable d'hydrolyser l'adénosine ou la déoxy-adénosine pour produire de l'inosine ou de la déoxy-inosine (**figure 18**). Son activité peut être inhibée par la purine riboside, qui subira les premières étapes de la réaction catalytique, pour donner un produit hydraté HDPR pour 6-hydroxyl-1,6-dihydropurine riboside, un analogue du tétraèdre intermédiaire.

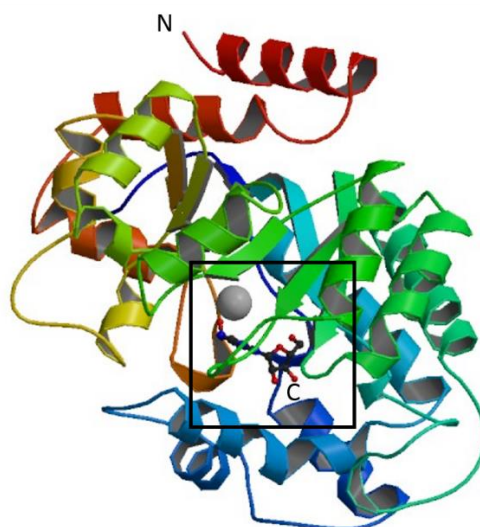


Figure 19: **Structure de la protéine murine Ada D296A, similaire à la structure de la protéine sauvage.** Les différents segments sont colorés en dégradé allant du rouge en N-terminal au bleu en C-terminal. Le site actif est encadré en noir. L'inhibiteur HDPR est représenté en bâtonnets bleus et la boule grise représente l'ion  $Zn^{2+}$ . D'après [147] dans Protein data bank.

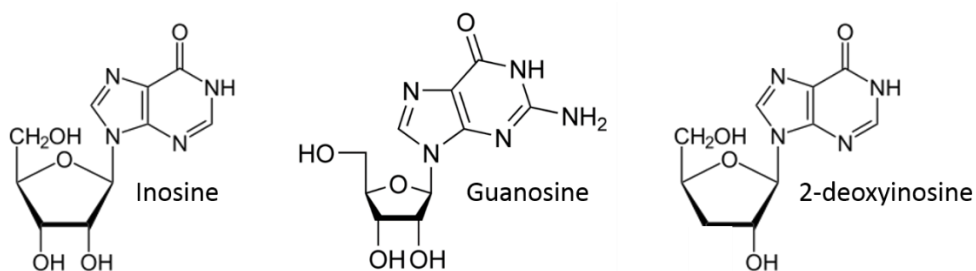


Figure 20: **Substrats de l'enzyme PNP.**

### (b) *Structure*

La structure cristallographique de la protéine de plusieurs espèces est disponible. C'est le cas de la protéine murine qui présente plus de 90% d'homologie avec son orthologue humain [148]. ADA est une protéine monomérique, de type tonneau triosephosphate isomerase (TIM), composée de huit feuillets- $\beta$  entourés de huit hélices- $\alpha$  périphériques [148] (**figure 19**). Le site actif est formé par l'extrémité C-terminal des feuillets- $\beta$  et d'une boucle formée par un feuillet- $\beta$  et une hélice- $\alpha$  et contient un site de liaison à l'ion métal  $Zn^{2+}$ .

### (c) *Mécanisme*

La structure en tonneau TIM est l'une des structures les plus communes, car elle serait retrouvée dans plus de quinze familles d'enzymes différentes [149]. Dans le cas de la protéine ADA, l'ion  $Zn^{2+}$  polarise une molécule d'eau qui attaque le substrat pour former un tétraèdre intermédiaire au niveau du carbone C6 cycle purine [148].

### (d) *Distribution*

Chez les mammifères, l'ADA est une enzyme ubiquitaire. Son activité enzymatique est détectée dans de très nombreux tissus, et notamment dans le thymus et le tube digestif, où la protéine ADA est très fortement exprimée [150, 151].

## (2) Purine nucléoside phosphorylase – PNP

La purine nucléoside phosphorylase (PNP) est une enzyme principalement localisée dans le cytoplasme dans les organismes procaryotes et eucaryotes [35, 152]. Cependant, il a également été démontré que cette protéine peut être exprimée à la surface cellulaire où elle va réguler la concentration en nucléoside extracellulaire, en conjonction avec l'enzyme ADA. En effet, l'enzyme PNP est capable de dégrader l'inosine extracellulaire formée par l'ADA en hypoxanthine, à l'aide d'un phosphate inorganique. La réaction chimique est la suivante : nucléoside purine +  $P_i$   $\leftrightarrow$  base purine + ribose-1-phosphate.

### (a) *Substrats*

En plus de la dégradation de l'inosine en hypoxanthine, l'enzyme PNP est capable de déphosphoryler la guanosine en guanine [152]. Elle peut également déphosphoryler les dérivés désoxyriboses de l'inosine et guanosine en formant les mêmes produits purines (**figure 20**). Cependant, contrairement à la protéine bactérienne, l'enzyme de mammifère ne peut pas dégrader l'adénosine et le deoxyadénosine.

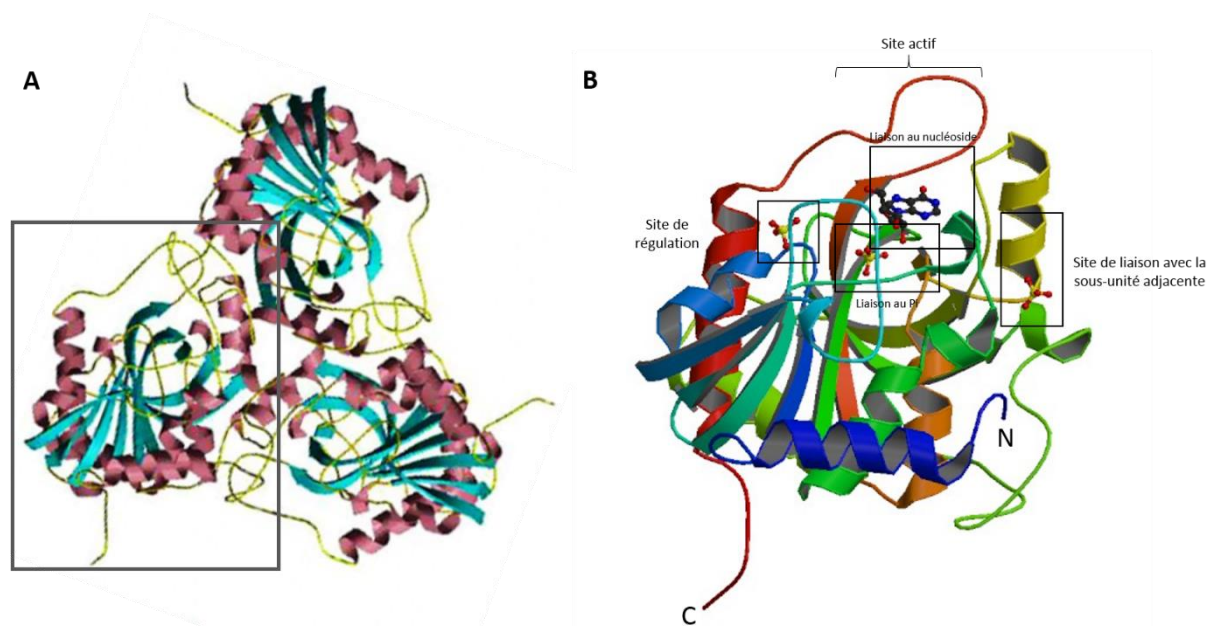


Figure 21: **Structure de la protéine PNP humaine.** A- Complexe trimérique de la protéine PNP. Les feuillets  $\beta$  sont représentés en bleu, les hélices  $\alpha$  en rose et les boucles en jaune. Un monomère est encadré en gris. (D'après [153]) B- Monomère constituant la PNP couplé à l'inosine. Les différents segments sont colorés en dégradé allant du rouge en C-terminal au bleu en N-terminal. L'inosine est représentée en bâtonnets bleus et 3 groupements phosphates sont représentés en jaune. Chaque domaine de liaison est indiqué et encadré en noir. Le 4ème groupement phosphate très proche du site de liaison au ribose n'est pas dessiné. D'après [154] dans Protein Data Bank.

Il existe des inhibiteurs se fixant aux sites de liaison du substrat, entraînant une diminution ou un blocage de l'activité enzymatique de la PNP. C'est le cas d'analogues riboses dont le cycle pentose est remplacé par un autre domaine cyclique ou non. Chaque substrat fait intervenir des liaisons hydrogènes différentes avec la protéine PNP.

#### (b) *Structure*

L'enzyme PNP est un complexe homo-trimérique de 90 à 100kDa [154] (**figure 21A**). Chaque monomère est constitué de feuillets  $\beta$  et hélices  $\alpha$ , reliés entre eux pour former un arrangement en tonneau  $\beta$ . Cette structure contient le cœur catalytique constitué d'un site de liaison au domaine purine du substrat, un site hydrophobe de liaison ribose, ainsi qu'un site de liaison au phosphate inorganique (**figure 21B**).

Grâce aux différentes structures, couplées [154, 155] ou non [153] à divers substrats et molécules, obtenues par cristallographie, quatre sites de liaison à un groupement phosphate ont été décrits. Le premier lie le phosphate inorganique impliqué dans la réaction catalytique. Un deuxième phosphate aurait un rôle régulateur sur la réaction. Un troisième phosphate est impliqué dans la liaison entre les différentes sous-unités de l'enzyme. Ces trois premiers phosphates sont représentés dans la **figure 21**. Le quatrième phosphate est situé au niveau du site de liaison du ribose. En effet, cette partie est très hydrophobe et le phosphate jouerait un obstacle à la reconnaissance du substrat et entraînerait l'inhibition de l'activité enzymatique dans des conditions riches en phosphate.

#### (c) *Mécanisme*

La liaison du substrat au site actif entraîne un changement de conformation de la protéine [154]. En effet, les résidus 241 à 260 agissent comme une porte qui s'ouvre lors de la liaison du substrat. Cette porte permet de contrôler l'accès au site actif.

#### (d) *Distribution*

Le gène *PNP* est considéré comme un gène de ménage car il est exprimé de manière ubiquitaire dans les tissus humains. Chez l'homme, l'activité enzymatique a été fortement détectée dans le cerveau, le rein, le foie, les poumons, l'intestin grêle, le cœur, la rate et les cellules et tissus immunitaires [152].

#### (e) *Rôle dans l'immunodéficiency*

La fonction principale de l'enzyme PNP est le catabolisme et le recyclage des nucléotides. Cependant, chez l'homme, et dans les modèles murins, une déficiency en PNP entraîne une immunodéficiency sévère [156]. En effet, en absence de PNP, ses substrats vont s'accumuler dans le

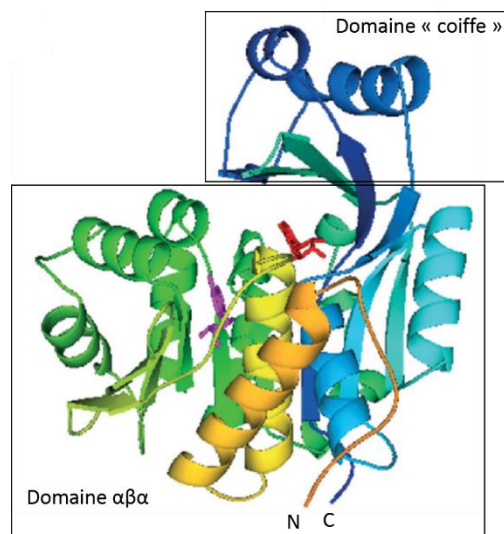


Figure 22: **Structure fermée de l'enzyme ADK humaine.** Les bâtonnets violets et rouges représentent deux molécules d'adénosine, une dans le site catalytique (rouge) et l'autre dans le site de régulation (violet). D'après [157].

cytosol. Le substrat lymphotoxique est la deoxyguanosine. Ce dernier est phosphorylé par différents enzymes en dGTP qui va, à son tour, inhiber l'activité ribonucleotidase reductase de la cellule ( $\text{NDP} \rightarrow \text{dNDP}$ ) et inhiber ainsi la synthèse d'ADN mitochondrial et sa réparation. Ce phénomène entraîne une mort cellulaire par apoptose. Deux hypothèses sont proposées pour expliquer la spécificité de ce phénomène aux lymphocytes-T : (1) les lymphocytes T ont une forte activité deoxyguanosine kinase en comparaison avec les lymphocytes-B et les autres tissus et (2) les thymocytes immatures sont plus susceptibles à l'apoptose au cours de la sélection des cellules-T.

### (3) Adénosine kinase – ADK

L'adénosine kinase (ADK) est une ATP:adénosine 5' phosphotransférase qui catalyse la phosphorylation de l'adénosine pour former de l'AMP et ADP à partir de l'ATP préférentiellement ( $K_m = 0,2 \text{ à } 2 \mu\text{M}$ ) [158]. La réaction chimique est la suivante :  $\text{adénosine} + \text{ATP} \rightarrow \text{AMP} + \text{ADP}$ . Cette enzyme appartient à la famille des ribokinases (RK) [157]. En conditions normales, l'adénosine intracellulaire est préférentiellement métabolisée par l'enzyme ADK plutôt que l'enzyme ADA. La protéine ADK est considérée comme un point de contrôle de la concentration en adénosine dans la cellule, elle est la nucléoside kinase la plus abondante dans les tissus mammifères.

#### (a) Structure

La première structure obtenue par cristallographie est celle de la protéine ADK humaine en 1998 [159]. La forme active de l'ADK est un monomère (**figure 22**). Il est composé d'un large domaine sandwich  $\alpha\beta\alpha$ , constitué de neuf feuillets  $\beta$  et dix hélices  $\alpha$ , formant le site de liaison à l'adénosine et l'ATP et le cœur catalytique, et d'un petit domaine formé par cinq feuillets  $\beta$ , flanqués de deux hélices  $\alpha$ , formant une « coiffe » par-dessus le site actif de l'enzyme [157, 159]. Les deux extrémités N- et C-terminales sont situées au niveau du domaine  $\alpha\beta\alpha$ . Un second site de liaison avec une plus faible affinité pour l'adénosine joue le rôle de régulation.

#### (b) Mécanisme

La liaison de l'adénosine à l'enzyme ADK dans sa conformation ouverte, entraîne une rotation de  $30^\circ$  du domaine « coiffe » au-dessus du site catalytique. Ceci permet la séquestration de l'adénosine et la formation du site de liaison à l'ATP. La liaison de ce dernier engendre un nouveau changement de structure en conformation fermée permettant le transfert de phosphate de l'ATP à l'adénosine en utilisant un ion  $\text{Mg}^{2+}$ . Après retour à la conformation ouverte, les ADP et AMP néo-formés peuvent être libérés.





### (c) *Substrats et régulation*

Pour une réaction optimale, le substrat donneur de phosphate est préférentiellement l'ATP. Cependant, plusieurs autres composants, comme le GTP, peuvent les remplacer dans la réaction catalytique [160].

En plus de l'adénosine, les nucléosides et leurs analogues étant efficacement phosphorylés par cette enzyme diffèrent généralement de l'adénosine en 2-, 6-, 7-, 8- et 9- de la base purine [161]. De plus, il existe un certain nombre de substrats, pouvant se fixer sur le site de liaison à l'adénosine, mais n'entraînant pas de changement de conformation, ce sont les inhibiteurs compétitifs [162]. Certaines de ces molécules sont utilisées en cliniques et seront détaillées dans la partie II.

Physiologiquement, de nombreux métabolites régulent l'activité de l'enzyme ADK [163]. L'adénosine elle-même, en concentration supérieure aux conditions physiologiques (en cas de stress cellulaire par exemple), affecte son activité enzymatique. Cette propriété régulatrice fait intervenir le second site de liaison à l'adénosine. L'activité enzymatique dépend également de la concentration cellulaire en AMP, mais ce dernier agit de manière compétitive sur le site de liaison à l'adénosine et non-compétitive sur le site de l'ATP.

### (d) *Distribution*

Il existe deux isoformes intracellulaires chez les mammifères, mais de taille et de sublocalisation cellulaire différentes [164]. L'isoforme longue, plus longue de vingt et une acides aminées, est nucléaire, alors que l'isoforme courte est cytosolique. Ces deux isoformes sont fortement exprimées dans le rein, le foie, les poumons et le pancréas. Cependant, l'isoforme longue est exprimée de manière dominante dans le cerveau et elle est la seule exprimée dans le cœur et les muscles. L'isoforme courte est, quant à elle, exprimée majoritairement dans la rate et le thymus.

## (4) *Xanthine Oxydase – XO*

La xanthine oxydase (XO) est une métalloflaoprotéine homodimérique, qui convertit en deux étapes l'hypoxanthine en xanthine, puis en acide urique à l'aide d'une molécule d'O<sub>2</sub> [165]. Elle est fortement exprimée dans les cellules épithéliales intestinales, hépatiques et en plus faibles quantités dans le cerveau, l'œil et les poumons [166]. Elle peut également être sécrétée en grande quantité dans le lait maternel humain et animal [166, 167] et dans le sang [168]. Cette enzyme est impliquée dans de nombreux processus physiologiques [169] comme la prolifération et la mort cellulaire [170], dans l'immunité [166], mais également dans des pathologies humaines comme les maladies cardiovasculaires [171] et le diabète [172]. Cette enzyme a également un rôle protecteur dans divers types de cancer [173].

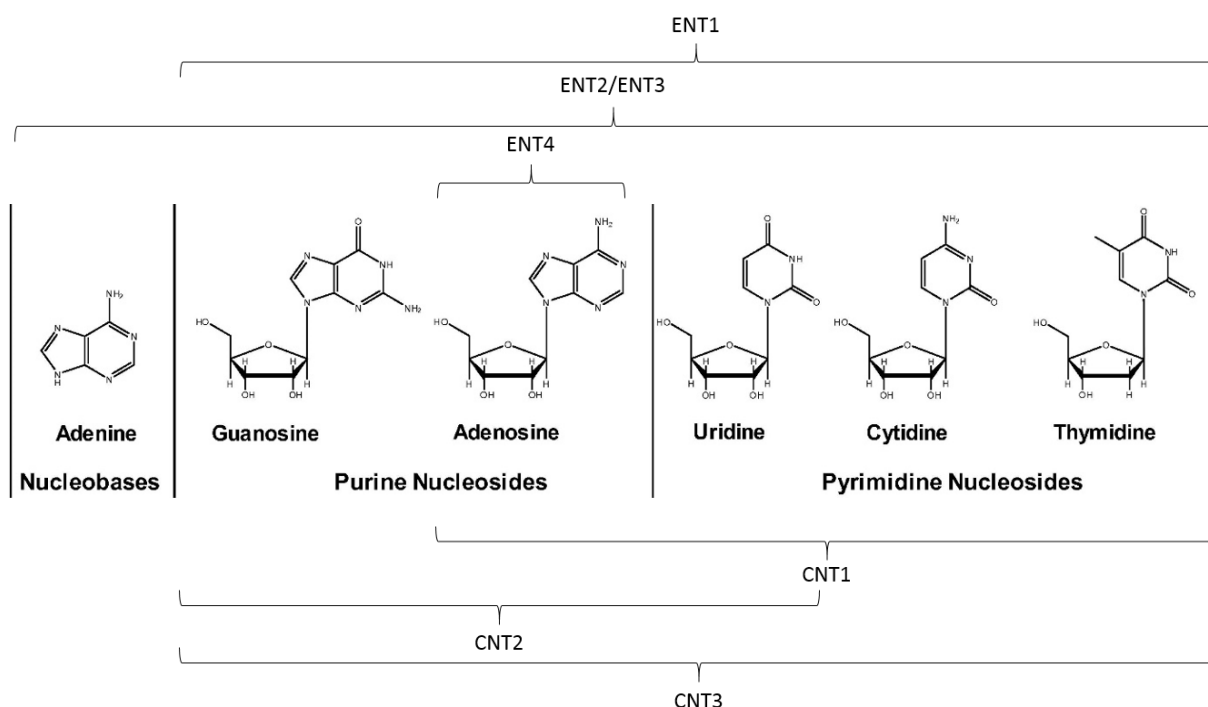


Figure 23: **Métabolites naturels transportés par les transporteurs de nucléotides (CNT et ENT).** D'après [174].

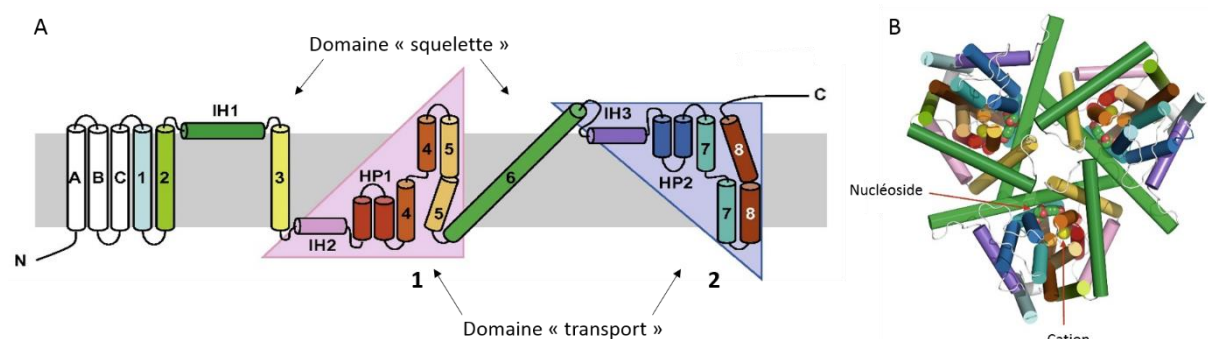


Figure 24: **Structure des transporteurs CNTs.** (A) Topologie d'un monomère CNT2 humain. Chaque domaine est indiqué et représenté d'une couleur différente. Les sous-domaines impliqués dans le transport sont indiqués dans des triangles rose et bleu. (B) Structure trimérique de la protéine CNT bactérienne, vue de la surface membranaire. Les couleurs correspondant à chaque domaine sont les mêmes que dans le panel (A). Le nucléoside (ici uridine) et le cation (ici Na<sup>+</sup>) liés sont représentés en boules de couleur. D'après [174].

#### d) *Transporteurs*

L'adénosine, qui est présente en forte concentration dans l'espace extracellulaire aussi bien qu'à l'intérieur de la cellule, ne diffuse pas librement à travers la membrane. Elle va emprunter deux sortes de transporteurs de nucléosides spécifiques, appelées soit concentratifs (CNT), soit équilibratifs (ENT) [174].

##### (1) Transporteur de nucléosides concentratif – CNT

Les transporteurs de nucléosides concentratifs (CNT) permettent l'entrée spécifique des nucléosides à travers la membrane plasmique, à l'aide d'un cation. Chez l'homme, il existe trois gènes nommés *SLC28A1* à 3, codant pour les trois protéines CNT1 à 3 [174].

##### (a) *Substrats*

Chez l'homme, les trois CNTs transportent des nucléosides physiologiques (**figure 23**), mais également des analogues thérapeutiques anti-viraux ou anti-cancéreux [174].

Les trois transporteurs CNTs transportent l'uridine, mais possèdent des préférences différentes pour les autres nucléosides. CNT1 est plus sélectif pour les nucléosides pyrimidines, et faiblement pour l'adénosine, CNT2 pour les nucléosides purines et CNT3 pour les deux types de nucléosides (**figure 23**).

Afin de bloquer le transport des nucléosides vers l'intérieur de la cellule, plusieurs inhibiteurs ont été synthétisés à partir de l'uridine [174, 175]. Cependant, jusqu'à présent, aucun inhibiteur à très forte affinité pour ces transporteurs n'est connu.

##### (b) *Structure*

A ce jour, la structure des transporteurs CNT humains n'a pas été déterminée par cristallographie. Cependant, les études mécanistiques et structurales de ces protéines sont basées sur la structure connue du transporteur CNT bactérien *Vibrio cholerae* liée à l'uridine et au sodium [176], ainsi que sur des études fonctionnelles de protéines humaines mutantes exprimées à la surface d'ovocytes de xénope [177-179] (**figure 24**).

Le transporteur bactérien est homo-trimérique [176]. Chaque monomère contient huit domaines trans-membranaires (1-8), trois hélices parallèles à la membrane (IH1-3) et trois hélices formant des épingles à l'intérieur de la membrane (HP1 et 2) (**figure 24**). Le domaine N-terminal est cytoplasmique alors que le C-terminal est extracellulaire. Les protéines humaines possèdent une extension en N-terminal de trois domaines TM (A, B et C), mais qui ne seraient pas nécessaire à l'activité de transport [180].

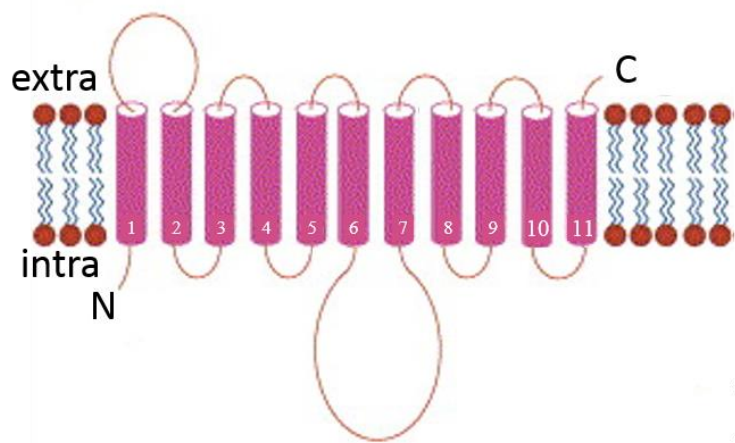


Figure 25: **Représentation des transporteurs ENT de mammifère.** Les domaines transmembranaires sont numérotés de 1 à 11. D'après [181].

Les domaines TM 1, 2, 3 et 6 ainsi que IH1 constituent le domaine « squelette », entourant le domaine « transport » qui, lui est subdivisé en deux sous-domaines. Le premier est composé des domaines IH2, HP1, TM 4 et 5, et le second des domaines IH3, HP2, TM7 et 8. Les résidus contribuant au passage des nucléotides appartiennent aux deux sous-domaines, et font intervenir les domaines HP1 et 2, TM4 et 7. Le site de liaison au sodium, quant à lui, fait intervenir les domaines HP1 et TM4.

### (c) Mécanisme

Le mécanisme de transport des nucléosides par ces transporteurs ferait intervenir plusieurs conformations : une où le site de liaison aux nucléosides serait inaccessible et caché dans la membrane plasmique et une autre où le site de liaison serait entièrement accessible [176]. La liaison et le relargage des nucléosides entraîneraient la transition entre ces différentes conformations. Cependant, la nature de ces transitions n'est pas claire.

L'entrée de nucléosides fait intervenir un ion  $\text{Na}^+$  qui, lorsqu'il se lie au transporteur, va augmenter l'affinité pour le nucléoside. Le cation sera cotransporté avec le métabolite à travers la membrane. Le transporteur CNT3 est le seul qui peut également utiliser  $\text{H}^+$  seul, ou avec  $\text{Na}^+$  [182].

## (2) Transporteur de nucléosides équilibratif - ENT

Les transporteurs de nucléosides équilibratifs (ENT) permettent le transport spécifique des nucléosides et nucléobases de manière bidirectionnelle à travers les membranes. Chez l'homme, il existe quatre gènes nommés *SLC29A1* à 4, codant pour quatre protéines ENT1 à 4.

### (a) Substrats

Chez l'homme, les quatre ENTs transportent des nucléosides physiologiques et des analogues thérapeutiques, mais également des nucléobases différentes (**figure 23**) [181]. Les ENT1, 2 et 3 peuvent transporter tous les nucléosides, alors qu'ENT4 peut transporter exclusivement de l'adénosine. Le transporteur ENT2 et très faiblement ENT1, peuvent également reconnaître les nucléobases comme l'hypoxanthine, l'adénine, la thymine, l'uracile, la guanine et la cytosine (exclusivement ENT2). Parmi les nucléobases, ENT3 ne peut transporter uniquement l'adénine. De plus, comme pour les transporteurs CNTs, les ENTs sont perméables à des drogues synthétiques anti-virales.

### (b) Structure

Les transporteurs ENT sont composés de onze domaines transmembranaires (TM 1 à 11) (**figure 25**). Les protéines humaines n'ont pas été cristallisées, cependant, des études de mutagenèse réalisées avec les protéines humaines et de rat ont permis d'établir différentes propriétés [177, 181]. Les domaines TM 1 à 6 joueraient un rôle dans le transport des nucléosides, alors que les domaines TM 5 et 6 seraient impliqués dans le transport des nucléobases [181]. De plus, les résidus présents dans les domaines TM

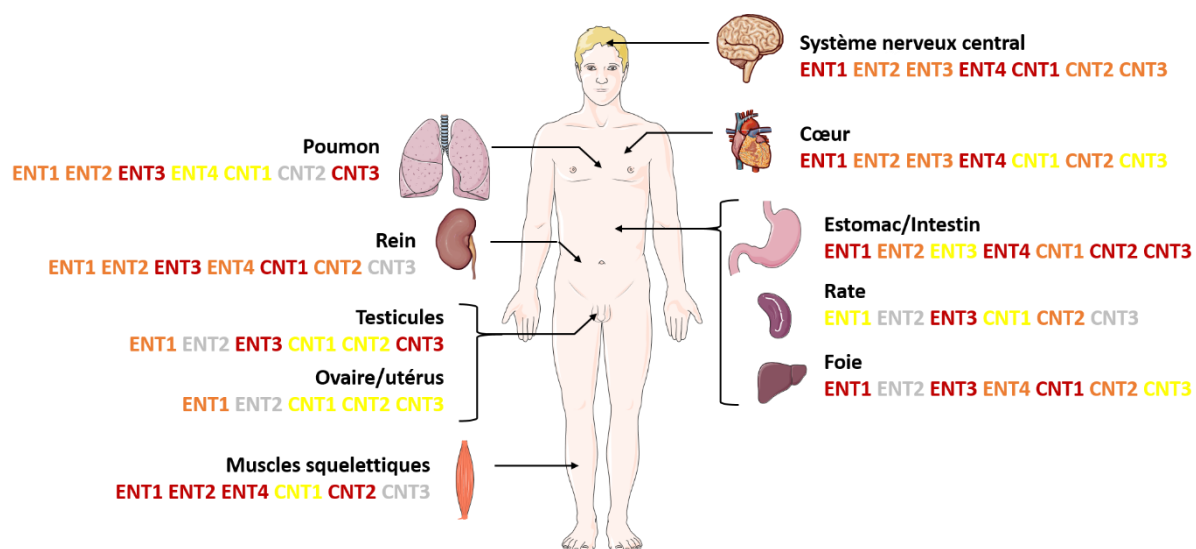


Figure 26: **Expression des transporteurs de nucléosides CNT et ENT chez l'adulte.** Le niveau d'expression de chaque transporteur dans les différents organes est représenté par un code couleur : fort en rouge, moyen en orange, faible en jaune et nul en gris. Ce schéma est basé sur les résultats obtenus chez l'homme et le rat [174, 181, 183-186].

1, 8 et 11 seraient importants pour le site de liaison aux inhibiteurs et les domaines TM 2, 4, 5, 7 et 8 pour la translocation des substrats et/ou la liaison au NBMPR (Nitrobenzylthioinosine) [177].

### (c) Mécanisme

Les transporteurs ENT1 et ENT2 transportent leur substrat par diffusion facilitée, mais le mécanisme de transport des ENT3 et 4 n'est pas clair et pourrait faire intervenir la liaison d'un proton [174].

### (3) Distribution

Les transporteurs de nucléosides possèdent une large répartition à la surface des cellules des différents tissus (**figure 26**) [174, 181, 185], cependant les transporteurs CNT3 et ENT3 présentent la plus large distribution [181, 184]. Ces derniers sont également exprimés dans les compartiments intracellulaires. CNT3 aurait un rôle au niveau du réticulum endoplasmique [187], alors qu'ENT3 transporte ses substrats à travers les membranes lysosomales [188] et mitochondriales [189].

## II- Rôle de l'adénosine extracellulaire

La complexité de la voie de signalisation de l'adénosine rend l'étude du rôle de cette purine extracellulaire difficile. En effet, comme pour toute molécule de signalisation, il faut prendre en considération les récepteurs assurant la transmission du signal extracellulaire. Mais, il faut aussi considérer les différentes enzymes listées dans le paragraphe précédent impliquées dans la génération et la dégradation de cette purine et donc modulant sa disponibilité dans l'espace extracellulaire.

Ainsi, les fonctions de l'adénosine extracellulaire ont été démontrées par différentes études fonctionnelles des membres intervenant dans sa voie de signalisation. Ces études, initialement réalisées chez les mammifères, consistent essentiellement en la perturbation de l'expression de ces acteurs *in vivo* ou *in vitro* par des méthodes génétiques, soit par génération de modèles knock-out ou knock-down, soit par surexpression. Des approches pharmacologiques ont également été utilisées *in vitro*, *ex vivo* sur des coupes de cerveau ou *in vivo*, notamment chez le rat. Ces approches sont plus rapides et simples, mais reposent sur la spécificité des agonistes et antagonistes utilisés.

### A. A l'âge adulte

Comme détaillé dans le paragraphe précédent, les différents acteurs de cette voie de signalisation sont exprimés dans tous les tissus et organes, souvent de manière chevauchante, chez le vertébré adulte. Ainsi, il n'est pas surprenant que l'adénosine extracellulaire soit impliquée dans la régulation des fonctions physiologiques de nombreux organes et types cellulaires. Son rôle chez l'adulte a été largement étudié et démontré dans le système nerveux [190], l'immunité et l'inflammation [191, 192],



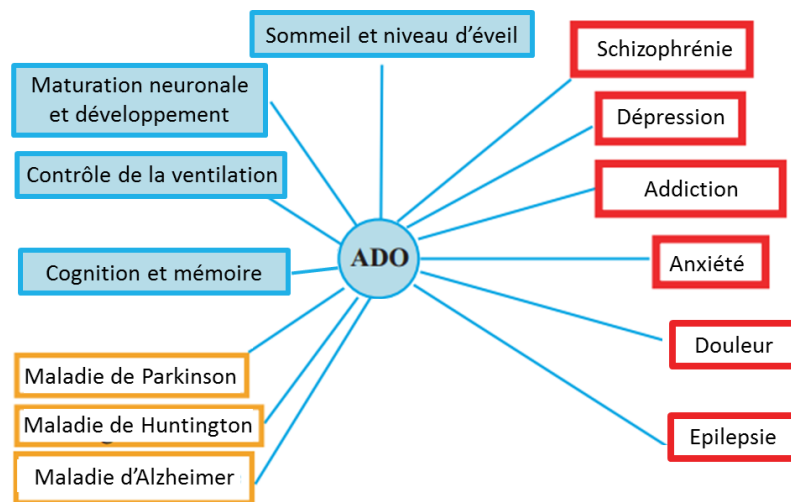


Figure 27: **Rôle de l'adénosine dans le système nerveux central.** Les fonctions cérébrales sont en bleu, les dysfonctionnements en rouge et les maladies en orange. ADO : adénosine. D'après [193].

le foie [194], le système urinaire [195], la différenciation cellulaire, la régénération tissulaire [196], etc. De plus, il est maintenant admis que l'adénosine extracellulaire est impliquée dans de nombreuses pathologies, telles que les maladies neuronales [59], les cancers [197, 198], le diabète [57], etc. Cette liste n'est pas exhaustive et pour cette raison, seulement quelques-unes des nombreuses fonctions de l'adénosine extracellulaire seront présentées ici

## 1. **Physiologie et pathophysiologie du système nerveux**

L'adénosine est un des neuromodulateurs les plus importants et répandus dans le cerveau. Son implication dans la physiologie cérébrale a été reconnue avant celle de l'ATP, grâce notamment à des études électrophysiologiques menées sur des coupes de cerveau [199]. ADORA1 est le récepteur le plus retrouvé dans le cerveau, alors qu'ADORA2a n'est exprimé fortement que dans certaines régions du cerveau, telles que le striatum et les tubercules olfactifs [200]. Les deux autres récepteurs ADORA2b et 3 ne sont que faiblement exprimés dans le cerveau, même si leur profil d'expression semble être ubiquitaire. Les récepteurs ADORA3 ont toutefois été localisés dans les terminaisons nerveuses au niveau de l'hippocampe [201].

Les sources d'adénosine dans l'espace extracellulaire sont multiples. Comme exposé précédemment, l'adénosine dans l'espace extracellulaire du système nerveux est généré *via* l'hydrolyse de l'ATP extracellulaire, lui-même libéré par les neurones ou les cellules gliales par exocytose ou *via* des canaux de type « gap junctions » ou par des transporteurs spécifiques de type ENT. Cependant, il a été démontré que des neurones et cellules gliales peuvent également sécréter directement l'adénosine [202]. Ces différents types de génération d'adénosine dans l'espace extracellulaire peuvent se produire ensemble, comme démontré récemment dans l'hippocampe [202].

L'adénosine a globalement un effet inhibiteur sur l'activité cérébrale. En effet, elle entraîne la sédation, des effets anti-épileptiques et anti-anxiété et nuit à l'apprentissage et à la mémoire à travers l'activation des différents récepteurs ADORA [190, 193] (**figure 27**). Ces effets sont dus à l'inhibition de la libération de neurotransmetteurs des terminaux synaptiques et à la réduction de l'influx calcique en réponse aux potentiels d'action [203]. En effet, le récepteur ADORA1 est couplé à l'activation des canaux potassium et à l'inhibition des canaux calcium conduisant à l'inhibition de l'activité neuronale. Ces récepteurs sont liés à l'inhibition de plusieurs, si ce n'est de tous les neurotransmetteurs, tels que le glutamate, le GABA, l'acétylcholine, la dopamine et la sérotonine. Toutefois, l'action inhibitrice majeure est sur la transmission glutaminergique. Les récepteurs ADORA2a sont liés à l'activation de l'adénylate cyclase et faciliteraient le relargage de neurotransmetteurs. Enfin, ces récepteurs ADORA peuvent interagir avec les récepteurs GABA<sub>B</sub> et dopaminergiques de type D1 et D2.

L'adénosine est responsable du cycle sommeil/éveil de manière antagoniste à l'ATP [204]. L'adénosine serait un facteur de sommeil et aurait un rôle neuroprotecteur contre l'épuisement

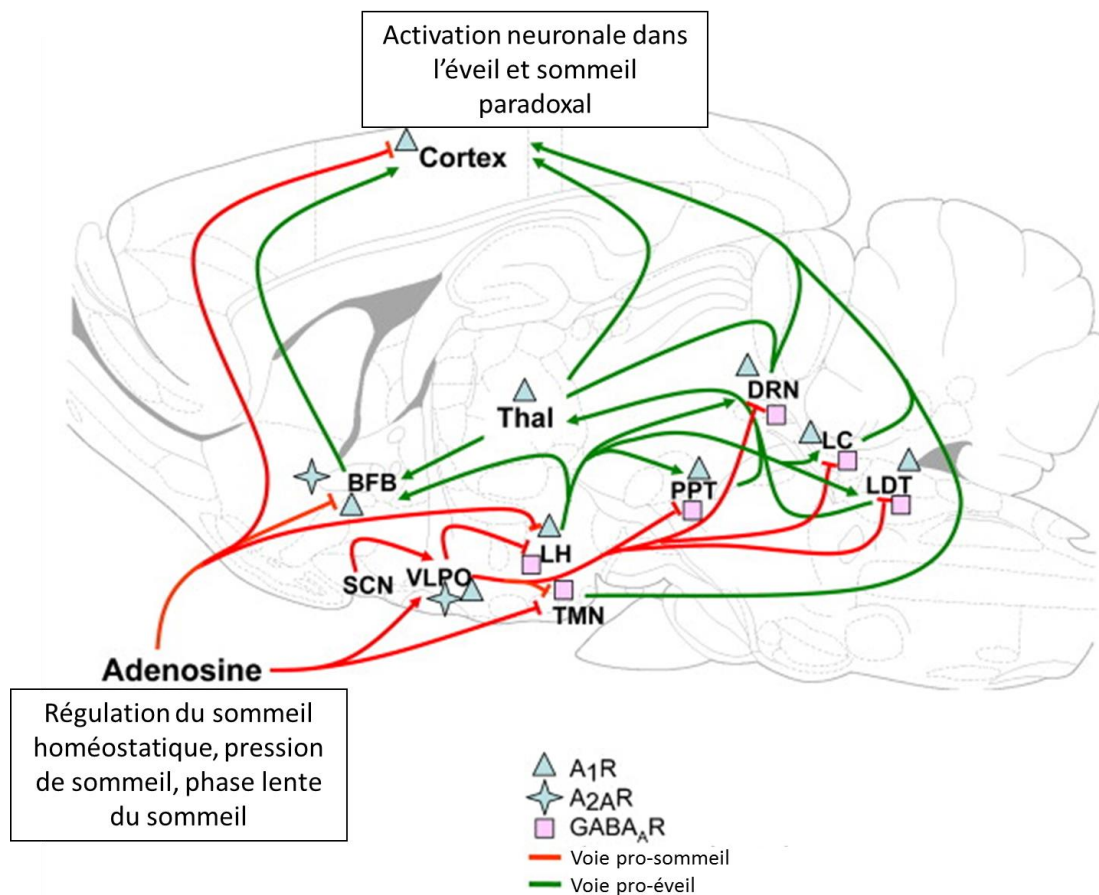


Figure 28: **Schéma de régulation des effets du sommeil et de l'éveil par l'adénosine.** Les différentes zones du cerveau impliquées sont indiquées. Les triangles bleus représentent les récepteurs ADORA1, les étoiles bleues les récepteurs ADORA2a et les carrés roses les récepteurs GABAergiques. L'augmentation des concentrations en adénosine après une période d'éveil peut inhiber le circuit subcortical pro-éveil (en vert) *via* les récepteurs ADORA1 et stimuler le circuit pro-sommeil (en rouge). L'activation des récepteurs ADORA2a dans le VLPO inhibe les récepteurs GABAergiques des structures ciblées stimulant l'éveil, et permet de passer de l'état d'éveil au sommeil. Au début du sommeil, les neurones du sommeil présents dans le VLPO sont activés par l'horloge circadienne localisée dans le SCN. La stimulation des récepteurs ADORA1 dans le VLPO induit des insomnies. BFB: cerveau antérieur basal ; Cortex ; DRN : noyau raphé ; LC : *locus coeruleus* ; LDT: noyau tegmental latérobasal ; LH: hypothalamus postérieur latéral; PPT: noyau tegmental pedonculopontine ; SCN: noyau suprachiasmatique ; Thal: thalamus ; TMN: noyau tuberomammarien ; VLPO: aire préoptique ventrolatéral. D'après [190].

énergétique [205]. Lors d'une augmentation du métabolisme et de l'activité neurale, c'est-à-dire pendant une période circadienne active, la concentration en adénosine extracellulaire augmente et diminue lors d'une période inactive [206]. De plus, l'administration de la caféine, qui est un antagoniste des quatre récepteurs ADORA, provoque une excitation cérébrale et une perte de sommeil [193]. Des études génétiques et pharmacologiques affectant l'expression ou l'activité des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'adénosine ont démontré l'implication de ces protéines dans les différentes phases du sommeil. Le sommeil est caractérisé par la succession de plusieurs cycles qui se répètent durant la nuit et composés de plusieurs phases : la première, la plus longue, est la phase dite lente caractérisée par des activités lentes sur des enregistrements cérébraux, qui comprend, entre autre, les phases de sommeil léger, de sommeil profond et très profond. La seconde est la phase de sommeil paradoxal, caractérisée par des mouvements oculaires rapides provoqués par les ondes du cerveau. La troisième, très courte, est la phase intermédiaire, débouchant sur un nouveau cycle ou sur le réveil. Les souris sur-exprimant l'enzyme Adk de façon constitutive restent plus longtemps éveillées et passent moins de temps en sommeil lent et surtout en sommeil paradoxal [207]. A contrario, les rats traités avec la molécule ABT-702 inhibitrice de cette enzyme ont une durée de sommeil profond plus longue [208]. De même, l'administration de l'inhibiteur conformycin de l'enzyme Ada augmente la durée du sommeil léger chez le rat [209]. Chez l'homme, des individus porteurs du polymorphisme du gène *ADA* affectant le nucléotide 22 (G modifié en A) entraînant une diminution de l'activité enzymatique ADA, dorment plus longtemps dans la phase de sommeil profond [210]. Ces études montrent donc le rôle direct de l'adénosine dans l'homéostasie du sommeil. Les récepteurs ADORA impliqués dans ce processus sont les récepteurs ADORA1 et ADORA2A [190]. Les effets de leur activation ou inhibition analysés lors d'études électrophysiologiques ont permis de mieux comprendre le mécanisme d'action de la voie de signalisation de l'adénosine lors des phases de sommeil/éveil (**figure 28**).

L'adénosine extracellulaire module les mécanismes de plasticité synaptique, permettant l'apprentissage et la mémoire, ainsi que les émotions. L'absence des récepteurs Adora1 ou Adora2a entraîne une augmentation de l'anxiété et de l'agressivité chez la souris [211, 212]. Des souris mutantes pour le transporteur *Ent1* (*Slc29a1*) ou pour lesquelles l'expression de ce gène est inhibée sont moins anxieuses lors du test « elevated plus maze » [213]. De façon intéressante, des polymorphismes affectant le gène *ADORA2a* ont été corrélés avec le trouble panique [193]. L'adénosine est également impliquée dans d'autres comportements comme la locomotion, l'alimentation [190]. De plus, la phosphatase acide prostatique (PACP) est impliquée dans la suppression de la douleur par la production d'adénosine [138].

L'adénosine est aussi impliquée dans les pathologies neuronales, notamment dans les maladies neurodégénératives [190]. Des analyses post-mortem de patients atteints de la maladie d'Alzheimer ont révélé la co-localisation du récepteur ADORA1 avec la  $\beta$ -amyloïde, peptide constituant les plaques amyloïdes de ces malades. De plus, l'activation de ce récepteur dans des cellules de neuroblastome

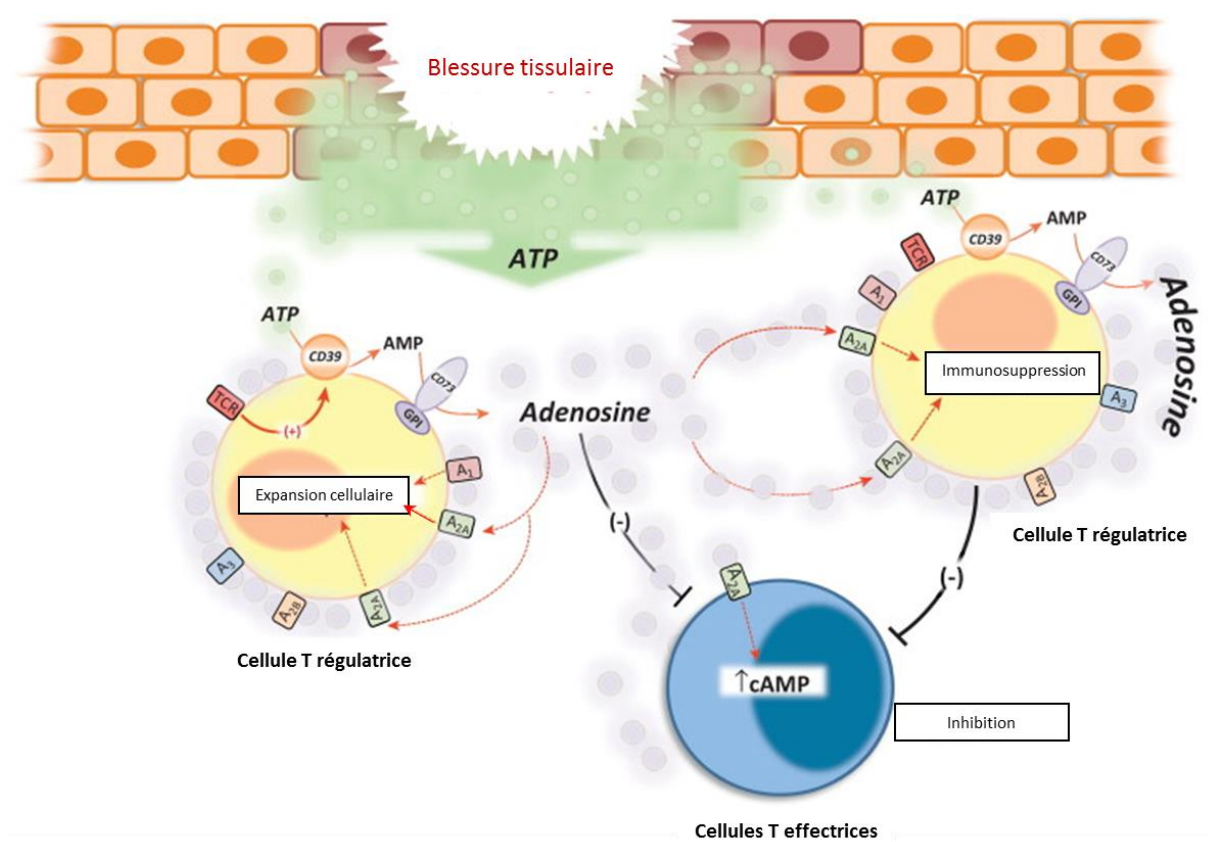


Figure 29: **La voie CD39/CD73 module l'activité des cellules T régulatrices.** Suite à une blessure tissulaire et à la libération d'ATP, l'activation des récepteurs des cellules T (TCR) exprimés à la surface des cellules T régulatrices (T reg), induit l'activité de la protéine NTDase1 (CD39). L'augmentation de cette activité facilite la génération péri-cellulaire d'adénosine, facteur anti-inflammatoire qui inhibe les fonctions immunitaires des cellules T effectrices par l'intermédiaire des récepteurs ADORA2a. De plus, la génération d'adénosine renforce l'activité immunosuppressive des cellules T régulatrices et stimule leur expansion. D'après [192].

activerait la formation de ce peptide. Dans le cas de la maladie de Parkinson, c'est le récepteur ADORA2a qui, de par son interaction avec le système dopaminergique, serait impliqué dans la pathophysiologie de la maladie. Des antagonistes de ce récepteur, BILBO14 et ST-1535, sont d'ailleurs en tests cliniques phase I et phase II. Bien que l'expression de ce même récepteur soit altérée dans des modèles animaux ou dans des cellules sanguines circulantes de patients atteints de la maladie de Huntington, les quelques études pharmacologiques ou physiologiques n'ont pas permis de conclure sur l'implication du récepteur ADORA2a dans cette maladie. L'implication de ces mêmes récepteurs, ADORA1 et ADORA2a, a été également démontrée dans les cas de désordres psychiatriques, telles que la schizophrénie, de migraines, d'épilepsie et des troubles de la douleur. Enfin l'adénosine possède une propriété antidépresseur impliquant l'activation de ces récepteurs [214].

## 2. **Immunité et inflammation**

Le rôle de l'adénosine dans l'immunité et l'inflammation a été particulièrement mis en évidence par les fonctions assurées par les enzymes impliquées dans son métabolisme. En particulier, l'ecto-enzyme CD73 (ou NT5E) est un marqueur de la maturation des lymphocytes et est co-exprimé à la surface des cellules T régulatrices avec l'ectonucléotidase NTPDase1/CD39 qui hydrolyse l'ATP et l'ADP en AMP (**figure 29**). La coopération de ces deux enzymes permet la formation d'adénosine, facteur anti-inflammatoire inhibant la prolifération des lymphocytes T, l'activation des mastocytes et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires [32, 86, 192, 215, 216]. Ces propriétés anti-inflammatoires s'effectuent principalement par l'intermédiaire du récepteur ADORA2a, principal ADORA récepteur exprimé sur les lymphocytes [217]. Cependant, les quatre récepteurs ADORA sont présents à la surface de toutes les cellules de l'immunité et régulent ainsi les réponses immunitaires innées et adaptatives. Le récepteur ADORA2B est présent, avec le récepteur ADORA2a, sur les cellules présentatrices d'antigènes et influence l'activation lymphocytaire. Les récepteurs ADORA2a, 2b et 3 sont exprimés à la surface des macrophages et leur activation régule la sécrétion de cytokines. Ainsi, la stimulation du récepteur ADORA2b entraîne la diminution de la sécrétion de l'IL-12, mais aussi du TNF $\alpha$  [218]. Le récepteur ADORA3, très exprimé à la surface des mastocytes, a également été impliqué dans les réponses pro et anti-inflammatoires [219].

La pathologie SCID pour « Severe Combined Immunodeficiency Disease » chez l'homme ou chez la souris est causée par une déficience en ADA [146]. En effet, l'accumulation des substrats de l'enzyme (adénosine et 2'deoxyadénosine) dans les lymphocytes B et T entraîne une sévère lymphopénie par apoptose et une immunodéficiência. De manière intéressante, la déficience en PNP chez l'homme et chez la souris également entraîne une immunodéficiência avec une réduction des lymphocytes T due à une altération de la différenciation thymocytaire [220].

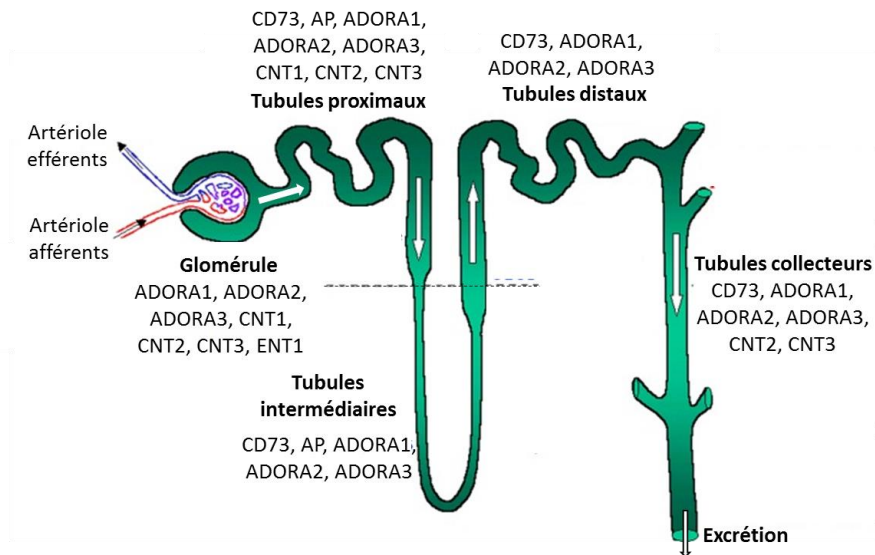


Figure 30: **Schéma simplifié d'un rein de mammifère** et expression des acteurs de la voie de signalisation le long des différents segments. Les différents segments du rein sont représentés et les protéines dont la localisation est connue sont indiqués. D'après [125, 221-223].

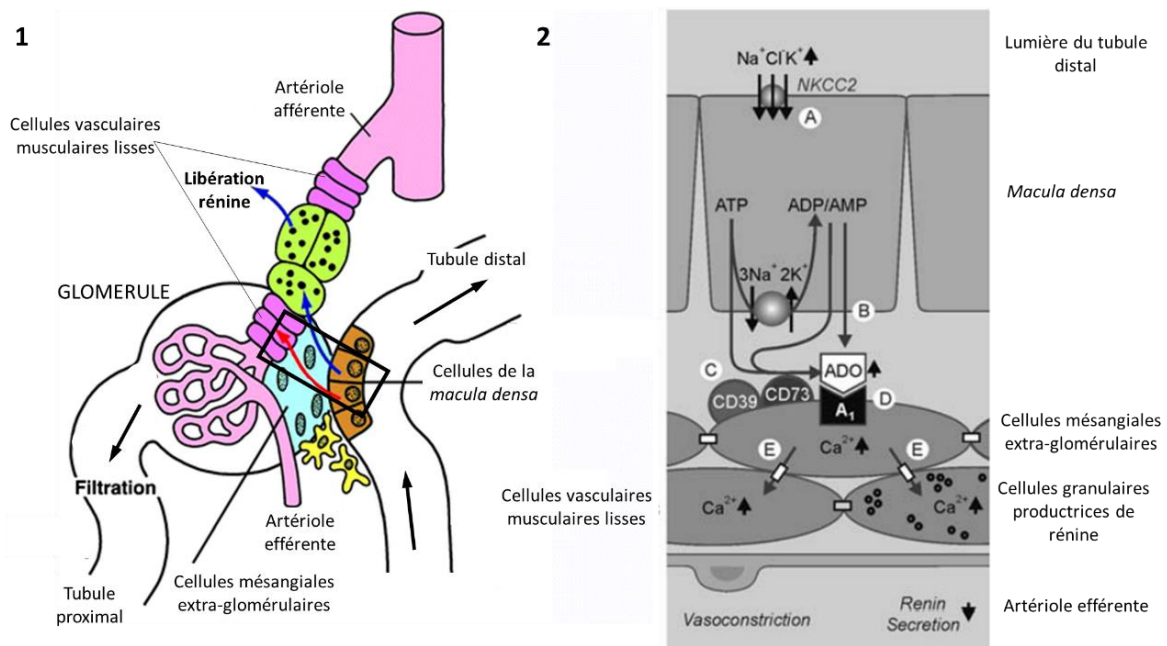


Figure 31: **Schéma du rétrocontrôle tubuloglomérulaire – rôle de l'adénosine**. 1- Représentation des tissus impliqués. Les flèches noires représentent le trajet du filtrat glomérulaire. La flèche rouge correspond au trajet de l'information de vasoconstriction et la flèche bleue à celui de la libération de rénine. Les cellules granulaires productrices de rénines sont représentées en vert. 2- Représentation de l'agrandissement du rectangle de (1). La concentration en sel est détectée par les cellules de la *macula densa*, grâce au transporteur  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  (NKCC2) (A), entraînant la libération directe (B) ou indirecte (C) d'adénosine. L'activation des récepteurs ADORA1 (D) entraîne l'augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  des cellules mésangiales extra-glomérulaires qui va se propager aux cellules vasculaires musculaires lisses et granulaires productrices de rénine *via* des jonctions gap (E). Ceci permet la vasoconstriction des artérioles efférentes et la diminution de la sécrétion de rénine. Les récepteurs ADORA2a et ADORA2b modulent également le rétrocontrôle tubuloglomérulaire. Ces deux récepteurs sont exprimés dans les artérioles afférentes et ont un effet vasodilatateur antagoniste à celui du récepteur ADORA1 [30, 224].

### 3. Physiologie du rein et pathophysiologies rénales

Le rein assure trois fonctions principales : l'élimination des déchets, la production d'hormones et la régulation des quantités d'électrolytes et d'eau dans l'organisme. Le sang des artérioles afférentes est filtré dans le glomérule. Le filtrat entre dans les tubules proximaux, passe par les tubules intermédiaires, puis distaux, où il va subir, au fur et à mesure, un appauvrissement en sels et eau par réabsorption, jusqu'à l'excrétion finale des déchets restants *via* le tubule collecteur (**figure 30**). Un grand nombre d'acteurs de la voie de signalisation de l'adénosine sont présents dans tous les segments du rein, avec toutefois un enrichissement dans les structures proximales (**figure 30**).

L'adénosine est impliquée dans la régulation du taux de filtration glomérulaire [195] (**figure 31**). En effet, le récepteur ADORA1 [225], ainsi que l'ectonucléotidase CD73 (NT5E) [226] sont indispensables au rétrocontrôle tubuloglomérulaire (TGF), réponse vasculaire des artérioles du néphron entraînée par le changement de taux de filtration glomérulaire. Cette réponse est entièrement inhibée dans des souris KO *Nt5e*, dont les récepteurs ADORA1 sont bloqués [227]. L'adénosine agit comme un médiateur du rétrocontrôle tubuloglomérulaire [195] (**figure 31**). L'ATP et l'adénosine sont libérées par les cellules de la *macula densa* en réponse à une augmentation de la concentration en NaCl ou potassium dans la lumière des tubules rénaux. Ces deux molécules sont libérées dans l'espace extracellulaire reliant les tubules rénaux au glomérule. L'enzyme CD73 présente à la surface des cellules mésangiales extra-glomérulaires permet de finaliser la formation de l'adénosine à partir de l'ATP. L'adénosine est ensuite reconnue par les récepteurs ADORA1, entraînant une activation des cellules musculaires lisses vasculaires et donc la vasoconstriction artériolaire [228], ainsi que l'inhibition de la sécrétion de rénine [229]. Par conséquent, la pression et le taux de filtration glomérulaire diminuent. L'implication du transporteur ENT1 a également été démontré dans la régulation du taux de filtration glomérulaire, car son absence constitutive chez la souris entraîne une augmentation du niveau d'adénosine circulant par manque de réabsorption et donc une inhibition de la réponse TGF [223].

L'adénosine régule aussi l'activité des tubules proximaux où les récepteurs ADORA1 et ADORA2a sont exprimés (**figure 30 et 31**) [230, 231]. Chez le lapin, le récepteur ADORA1 régule le co-transport  $\text{Na}^+ - 3\text{HCO}_3^-$  [232] et chez le cochon, l'activité de la pompe  $\text{Na}^+ - \text{ATPase}$  est stimulée par l'activation des récepteurs ADORA2a [233], régulant ainsi la réabsorption du sodium. Enfin, les récepteurs ADORA1 et ADORA2 sont aussi impliqués dans la réabsorption du  $\text{Mg}^{2+}$  au niveau des tubules distaux [234].

L'implication de l'adénosine dans certaines pathologies rénales a été démontrée. L'activation des récepteurs ADORA2b, en induisant la production d'IL-6, contribue à la fibrogenèse rénale [235], alors qu'elle protégerait le rein des lésions aiguës, *via* ADORA2a, par inhibition des neutrophiles et des cellules dendritiques [236, 237]. L'adénosine extracellulaire joue un rôle anti-inflammatoire dans



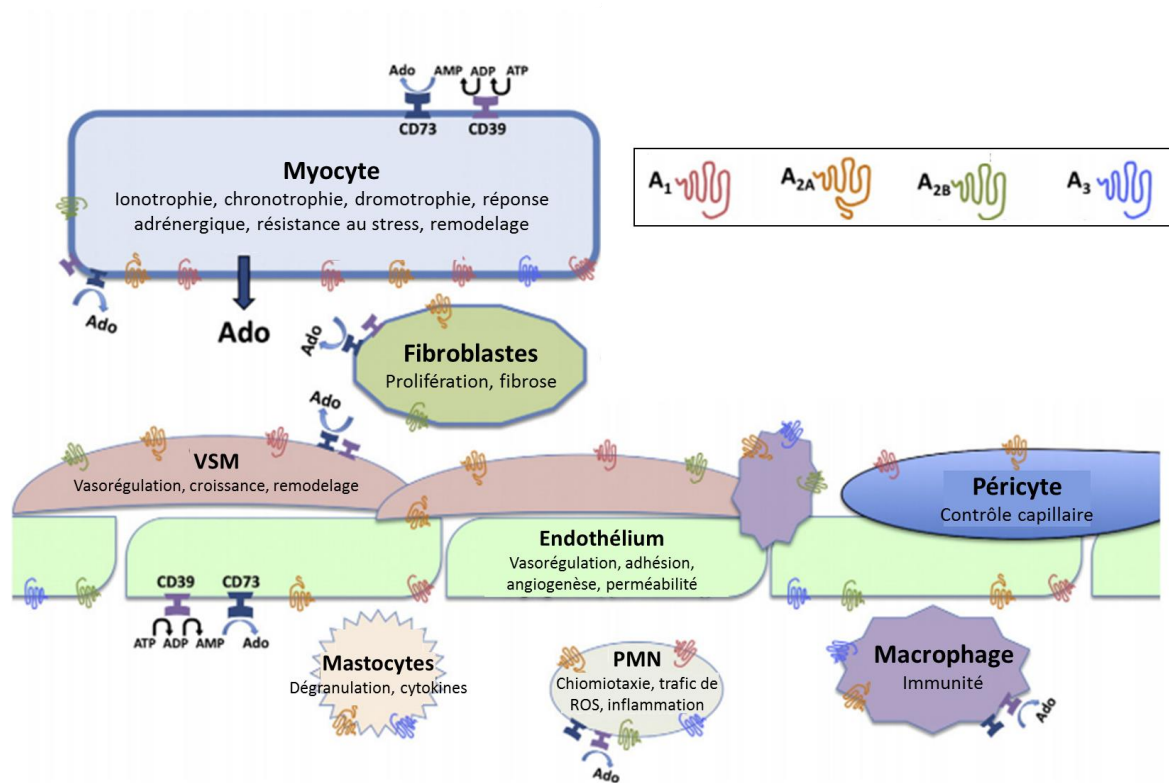


Figure 32: **Représentation simplifiée de la formation et du rôle de l'adénosine dans le cœur et les vaisseaux.** L'adénosine est générée par les nucléotidases intra- ou extracellulaire (CD39 en violet et CD73 en bleu foncé à la surface cellulaire) et interagit avec les quatre sous-types de récepteurs ADORA représentés en rouge (ADORA1), orange (ADORA2a), vert (ADORA2b) et bleu (ADORA3) à la surface cellulaire. Les différents types cellulaires, ainsi que le rôle de l'adénosine sont indiqués. PMN : leucocyte polymorphonucléaire ; VSM : muscle lisse vasculaire. D'après [238].

les glomérulonéphrites, car l'administration d'un inhibiteur de la réabsorption de l'adénosine atténue cette pathologie chez la souris [239]. L'activation des récepteurs ADORA2a serait aussi un traitement pour les inflammations du rein provoquées par les macrophages [240]. L'adénosine protège les rats diabétiques des néphropathies, car l'administration de l'agoniste NECA entraîne des effets hypoglycémiques et antioxydants et en réduisant l'expression des cytokines pro-inflammatoires [241]. L'antagoniste tonapofylline est utilisé en clinique pour traiter les insuffisances rénales ([242] et ClinicalTrials.gov).

#### 4. **Physiologie et pathologies du système cardiovasculaire**

L'effet de l'adénosine sur le système cardiaque a été un des premiers à être décrit. Les rôles cardiovasculaires de l'adénosine sont multiples, avec l'expression des quatre récepteurs détectés dans le cœur ainsi qu'au niveau des vaisseaux sanguins (**figure 32**). L'adénosine régule ainsi la contraction myocardique, le rythme cardiaque, le tonus vasculaire coronaire ainsi que la croissance vasculaire et cardiaque. Les récepteurs ADORA2a et ADORA3 sont également impliqués dans la régulation de la pression sanguine [211, 243].

L'adénosine a été largement étudiée comme agent cardioprotecteur et un intérêt grossissant s'est tourné vers cette purine comme agent thérapeutique dans des cœurs ischémiques. Par exemple, la génération de souris knock-out pour l'enzyme CD73 (NT5E) a montré les propriétés de cardioprotection de l'adénosine suite à une ischémie, par l'intermédiaire du récepteur ADORA2a [244]. L'adénosine est également impliquée dans des pathologies cardio-vasculaires. L'apadenoson est l'agoniste le plus sélectif pour ADORA2a et est utilisé en clinique pour traiter les pathologies cardiovasculaires [245]. De plus, une sur-expression du récepteur Adora1 chez la souris provoque des cardiomyopathies [246]. L'antagoniste tonapofylline, sélectif pour ADORA1, est utilisé en clinique dans le cas d'insuffisance cardiaque ([247] et ClinicalTrials.gov).

#### 5. **Prolifération et différenciation des cellules souches**

De nombreuses évidences ont récemment démontré l'importance de la voie de signalisation purinergique, notamment celle de l'adénosine dans la régulation de la prolifération, différenciation et mort des cellules souches et progénitrices. Une grande partie des études a clairement démontré l'implication de l'ATP et des récepteurs P2 lors de la prolifération et différenciation neuronale. Cependant, l'adénosine est également impliquée dans ces processus et joue un rôle ambivalent dans la neurogenèse [248]. En effet, l'adénosine peut soit stimuler la prolifération des cellules progénitrices neurales *in vitro* par l'intermédiaire du récepteur ADORA1 et de la voie MEK/ERK et Akt [249], soit l'inhiber en faisant intervenir le récepteur ADORA2a [250]. L'adénosine est également impliquée dans la différenciation neuronale [251]. Elle stimule la formation de neurones à partir de culture de cellules progénitrices neurales. En contrepartie, l'activation du récepteur ADORA1 inhibe la croissance

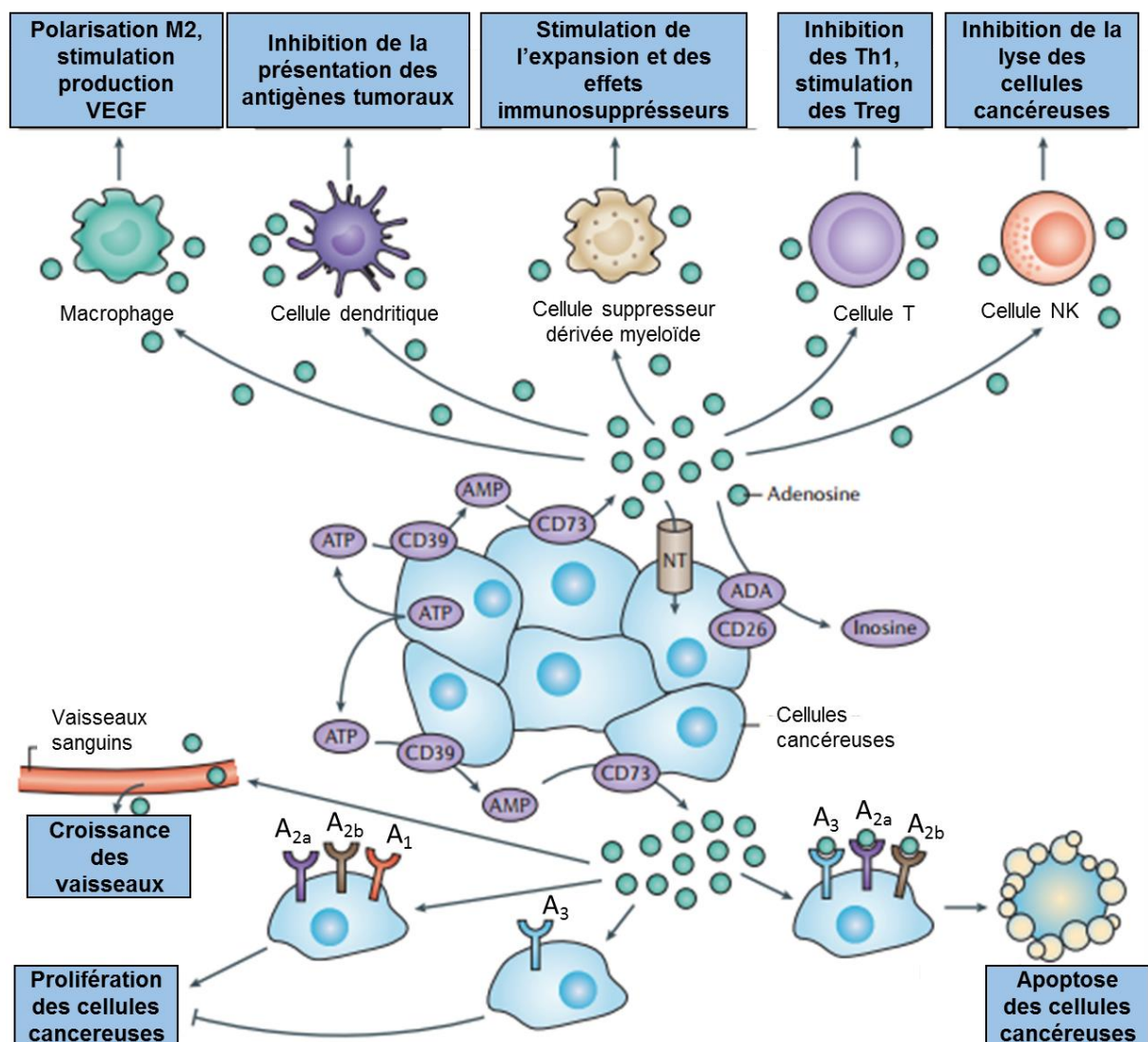


Figure 33: **Le rôle de l'adénosine dans le microenvironnement et la progression tumorale.** L'adénosine participe à la création d'un microenvironnement tumoral immunotolérant par la régulation des fonctions des cellules immunitaires et inflammatoires, comme les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules suppresseurs dérivées myéloïde, les cellules T et « natural killer » (NK). L'adénosine régule aussi la croissance et la dissémination du cancer en interférant avec la prolifération, l'apoptose et l'angiogenèse des cellules cancéreuses, *via* les récepteurs ADORA (A<sub>1</sub>, A<sub>2a</sub>, A<sub>2b</sub> et A<sub>3</sub>), exprimés à leur surface ainsi qu'à celle des cellules endothéliales. Les tumeurs solides expriment un haut niveau de CD39 et CD73, ainsi qu'un faible niveau de transporteurs nucléosidiques (NT), d'adénosine deaminase (ADA) et de son cofacteur CD26, qui augmentent la signalisation de l'adénosine dans l'environnement du cancer. TH1: T helper 1; Treg: T régulateur ; VEGF: « Vascular Endothelial Growth Factor ». D'après [252].

des axones par l'intermédiaire des kinases Rho [253]. L'activation des récepteurs ADORA2a par un agoniste spécifique montre des signes d'astrogliose dans le cortex du rat [254]. L'adénosine inhibe la prolifération des cellules de Schwann et des cellules précurseurs d'oligodendrocytes (OPC) induite par le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) *via* la stimulation des récepteurs Adora2a [255-257]. En revanche, l'adénosine stimule leur différenciation cellulaire en oligodendrocytes prémyélinisés [257] et l'activation des récepteurs ADORA1 induit la migration des OPC [258].

L'adénosine est aussi impliquée dans la prolifération et/ou la différenciation d'autres types de cellules souches. L'adénosine produite par les cellules stromales de la moelle osseuse régulerait la différenciation des cellules souches en cellules osseuses par l'intermédiaire du récepteur ADORA2b [259]. *In vitro*, l'adénosine stimule l'effet des facteurs de croissance et des cytokines libérées par les granulocytes et macrophages, sur la prolifération et la différenciation des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse [260]. L'adénosine stimule également la migration et prolifération des cellules épithéliales, ainsi que l'angiogenèse *via* les récepteurs ADORA2a [261-263].

## 6. Cancer

De nombreuses données récentes impliquent la voie de signalisation de l'adénosine dans le cancer. L'enzyme CD73 est surexprimée dans divers types de cancers chez l'homme et la souris et est impliquée dans le contrôle de la progression tumorale [264]. *In vitro*, la CD73 facilite l'adhésion, la migration et l'invasion des lignées cellulaires cancéreuses du sein via la production d'adénosine [265]. Les récepteurs ADORA sont également surexprimés dans les cellules tumorales [266-268]. Ainsi, l'adénosine est trouvée en concentrations élevées dans les tumeurs solides et favorise la croissance tumorale en stimulant l'angiogenèse tumorale et en inhibant les réponses immunes anti-tumorales [197, 269, 270] (**figure 33**).

L'adénosine régule l'activation, la différenciation et la maturation des cellules phagocytaires mononuclées induites par les tumeurs (macrophages, monocytes et cellules dendritiques) [192] (**figure 33**). En effet, l'adénosine inhibe l'activation des macrophages M1, via les récepteurs ADORA2a, mais stimule l'activation des macrophages alternatifs M2, fortement exprimés dans les tumeurs et possède des propriétés angiogénétiques, par l'intermédiaire des récepteurs ADORA2b [271]. L'adénosine peut également stimuler la production du facteur de croissance pro-angiogénique VEGF (« vascular endothelial growth factor ») par les macrophages. L'adénosine régule aussi les fonctions des cellules dendritiques [272]. Notamment, à travers l'activation des récepteurs ADORA2b, l'adénosine diminue la présentation d'antigènes tumoraux par les cellules dendritiques et la production d'interféron- $\gamma$  [217]. L'adénosine peut stimuler l'expansion de cellules suppressors dérivées des cellules myéloïdes par l'intermédiaire du récepteur ADORA2a présent à leur surface. Ces cellules sont des cellules myéloïdes



immatures et possèdent la capacité de stimuler la croissance tumorale et métastatique en supprimant la surveillance immunitaire [273].

L'adénosine agit comme un inhibiteur de l'activation des lymphocytes T « Natural killer » (NK) dans le microenvironnement des tumeurs solides [274]. L'adénosine produite par les cellules T régulatrices (T reg) inhibe non seulement ces cellules NK, mais aussi les cellules T [192] (**figure 33**). En effet, les cellules Treg sont caractérisées par une forte production d'adénosine, nécessaire à leur activité immunosuppressive [275, 276]. De plus, l'adénosine active les récepteurs ADORA2a présents à la surface des cellules T, entraînant l'inhibition de leur activation [32]. Les fonctions des cellules NK sont inhibées par l'adénosine par inhibition du processus d'exocytose granulaire [277] et de leur capacité à adhérer aux cellules néoplasiques [278], par l'intermédiaire du récepteur ADORA2a [279].

Les cellules endothéliales expriment les enzymes CD39 et CD73 permettant la production d'adénosine [280] (**figure 32**). La suppression de leurs activités de manière génétique ou pharmacologique entraîne des défauts dans la néo-vascularisation tumorale [30, 281]. En effet, l'adénosine présente des propriétés pro-angiogéniques en régulant la production des facteurs anti- et pro-angiogéniques dans les cellules néoplasiques, *via* les récepteurs ADORA2b [282, 283] et ADORA3 (**figure 33**) [283, 284].

L'activation des récepteurs ADORA2a, 2b et 3 entraîne l'apoptose de certaines cellules cancéreuses. Cependant, l'adénosine possède des effets opposés sur la croissance cellulaire (**figure 33**). L'activation des récepteurs ADORA1, 2a et 2b stimulent la prolifération cellulaire, alors que les récepteurs ADORA3 ont des propriétés anti-tumorales. Les récepteurs ADORA1 et 2a sont impliqués dans la prolifération du cancer du sein [285-287] et le récepteur ADORA2b dans celle des cancers colorectaux [288] et de la prostate [289]. En revanche, l'administration d'agoniste du récepteur ADORA3 (CI-IB-MECA) inhibe la croissance des métastases osseuses [290]. Ce même agoniste inhibe la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques et induit l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose [291]. Ces différentes études mettent en avant les propriétés thérapeutiques de cette molécule dans ces types de cancer. Le même effet est observé dans des lignées cellulaires cancéreuses pulmonaires [292], du foie [293] de fibrosarcomes [294] en utilisant d'autres agonistes du récepteur ADORA3.

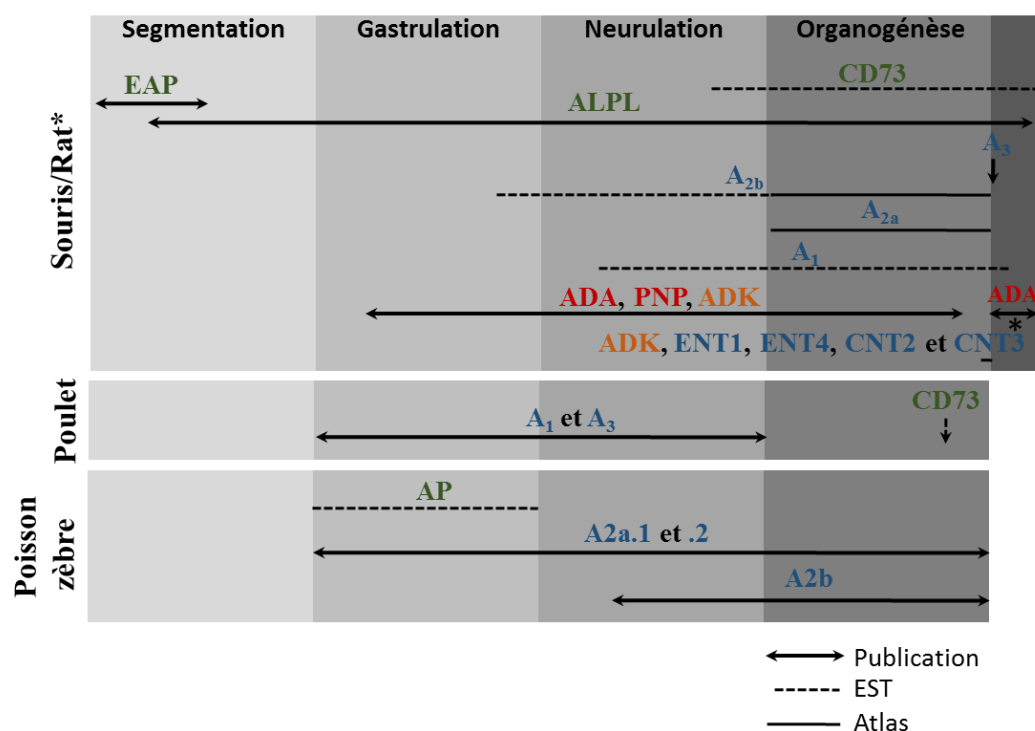


Figure 34: **Profil d'expression temporel connu des acteurs de la voie de signalisation de l'adénosine** dans les organismes modèles souris, poulet et poisson zèbre au cours des quatre phases l'embryogenèse (segmentation, gastrulation, neurulation et organogénèse) et de la croissance (gris foncé). Les flèches épaisses correspondent aux informations tirées de publications, les pointillés aux données issus des banques d'EST et les flèches fines aux renseignements obtenus dans les atlas. L'expression d'ADA signalée par un astérisque provient de données chez le rat. Inspiré de [295], les références sont indiquées dans le texte.

	Rongeur	Poulet	Poisson zèbre
<b>CD73</b>	Mésenchyme (souris)	?	?
<b>EAP</b>	Embryon stade 2 et 8 cellules (souris)	Non exprimé	Non exprimé
<b>TNAP</b>	Cerveau, squelette, ubiquitaire stades tardifs (souris)	?	?
<b>A1</b>	Cœur, tissus nerveux, rein (rat)	Cœur	?
<b>A2a</b>	Tissus nerveux (souris)	?	Multiple
<b>A2b</b>	Tissus nerveux (souris)	?	Multiple
<b>A3</b>	Cœur (souris)	Cerveau et muscle	?
<b>ADA</b>	Cartilage, tissus immunitaire, duodenum, rein, vaisseaux sanguins (rat)	?	?
<b>PNP</b>	Œil, nez, système digestif, rein, peau (souris)	?	?
<b>ADK</b>	Cerveau, système digestif, respiratoire, rein, vessie, squelette (souris)	?	?
<b>ENT1</b>	Foie (souris)	?	?
<b>ENT2</b>	Non exprimé (souris)	?	?
<b>ENT3</b>	Non exprimé (souris)	?	?
<b>ENT4</b>	Cerveau (souris)	?	?
<b>CNT2</b>	Système digestif (souris)	?	?
<b>CNT3</b>	Système digestif (souris)	?	?

Tableau 2 : **Expression spatiale connue des acteurs de la voie de signalisation de l'adénosine** dans les organismes modèles (rongeur, poulet et poisson zèbre). Les références sont mentionnées dans le texte.

## B. Au cours de l'embryogenèse

L'implication de l'adénosine dans la prolifération et la différenciation des cellules souches et progénitrices suggère que cette molécule joue un rôle au cours du développement embryonnaire. Cependant, le rôle de l'adénosine au cours de l'embryogenèse reste très peu étudié et les mécanismes impliqués demeurent incompris [295].

### 1. Expression

Plusieurs études ont permis de déterminer l'expression de certains acteurs de la voie de signalisation de l'adénosine au cours de l'embryogenèse (**tableau 2** et **figure 34**). La présence de ces enzymes ou récepteurs dans des tissus ou organes spécifiques et dans des phases de développement précises suggère que l'adénosine peut avoir un rôle au cours de la mise en place de ces tissus.

L'expression embryonnaire des récepteurs ADORA est la plus étudiée (**tableau 2**). Les gènes *Adora1*, *Adora2a* et *Adora2b* chez les rongeurs [230, 296, 297] et *ADORA3* chez le poulet [298] sont exprimés dans les tissus neuraux au cours de l'organogenèse. Le récepteur *Adora1* est exprimé dans le cœur chez la souris [296] et le poulet [299] et dans le rein chez le rat. Le récepteur *Adora3* est aussi exprimé dans les muscles [300]. Le profil d'expression des récepteurs *adora2a* et *adora2b* a été déterminé chez le poisson zèbre, montrant deux profils spécifiques pour chaque récepteur [301].

L'expression des gènes codant les enzymes Cd73 (Nt5e), Alpl (Tnap) et Eap a également été étudiée chez la souris (**tableau 2**). Le gène *Nt5e* est exprimé au niveau du mésenchyme [302], *Alpl* de façon spécifique dans les phases précoces du développement, puis de façon ubiquitaire dans les stades tardifs, dont dans le squelette et le système nerveux [128, 131, 303] et *Eap* est exprimé seulement dans les phases précoces du développement [303, 304].

L'activité des enzymes de dégradation de l'adénosine Ada, Pnp et Adk a été étudiée durant le développement embryonnaire de la souris entre le début de la gastrulation (stade E7) et la fin de l'organogenèse (E13). Le niveau d'activité de ces trois enzymes varie entre ces différents stades. Ceci montre qu'Ada, Pnp et Adk sont exprimés et certainement impliqués au cours du développement [305]. La localisation de l'adénosine déaminase Ada a été publiée dans quelques stades au cours du développement embryonnaire du rat [306]. Lors de la croissance embryonnaire, Ada est exprimée dans le cartilage (E15) et dans les tissus immunitaires (stade E17). Dans des stades plus tardifs, cette enzyme est détectée dans le duodenum, les tubules rénaux, le foie, les vaisseaux sanguins. Enfin, l'enzyme de dégradation de l'adénosine Adk est fortement exprimée de manière ubiquitaire [302].

Quelques informations concernant l'expression des transporteurs nucléosidiques sont également disponibles dans l'atlas transcriptomique obtenu à partir d'embryons de souris en fin d'organogenèse (stade E14.5) [302]. A ce stade, *Ent1* et *Ent4* présentent une forte expression dans le foie et le cerveau,





respectivement, alors qu'*Ent2* et *Ent3* ne sont pas exprimés. Les transporteurs *Cnt2* et *Cnt3* sont quant à eux exprimés dans le tube digestif.

## 2. Etudes fonctionnelles

Les quelques données exposées ci-dessus suggèrent que la voie de signalisation de l'adénosine est impliquée lors de l'embryogénèse des vertébrés. Cependant, il a été montré qu'un excès d'adénosine est néfaste pour le développement embryonnaire. En effet, l'administration d'adénosine sur des embryons bloque leur développement à des stades très précoces : au stade 2-cellules pour la souris [307] et au stade 256-cellules pour l'étoile de mer [308].

Chez la souris, la surexpression du récepteur *Adora1* sous le contrôle d'un promoteur cardiaque est létale avant la naissance en raison de défauts dans la morphologie et la fonction du cœur [246]. De même, la surexpression du récepteur *Adora3* sous le contrôle d'un promoteur musculaire lisse, cardiaque et squelettique chez la souris provoque une mort des embryons à des stades précoces du développement [300]. De plus, chez le poulet, l'activation des récepteurs *ADORA1* entraîne des malformations au niveau de la boucle cardiaque [299]. L'adénosine joue aussi un rôle dans la régulation de la vasculogénèse car, chez le poulet, l'activation des récepteurs *ADORA* par l'administration d'adénosine entraîne des défauts dans la croissance vasculaire [309]. Ces résultats suggèrent que l'adénosine est impliquée dans le développement du système cardiovasculaire et que l'activation de sa voie de signalisation est ici encore néfaste pour un bon développement embryonnaire.

L'adénosine joue également un rôle dans le développement des muscles. Chez le xénope, l'activation des récepteurs *adora* par administration d'agonistes entraîne des défauts de la formation des somites (précurseurs musculaires embryonnaires) [310]. Le blocage de ces récepteurs par des antagonistes provoque une désorganisation de l'angiogénèse inter-somitique et de la lymphangiogénèse chez l'embryon [311].

Chez la souris, l'adénosine extracellulaire régule négativement la croissance des membres [312]. En effet, l'effet de l'adénosine sur l'évolution d'excroissances digitales développées chez le mutant *Hmx/+* (pour « Hemimelia-extra toe ») a été étudiée *ex vivo* au stade 18 de gestation (E12). Ce mutant présente des altérations des zeugopode et autopode, conduisant à une réduction des éléments du squelette proximal associée à une présence surnuméraire des os métatarsiens et une polydactylie [312]. L'administration d'Ada exogène dégradant l'adénosine stimule l'expression de ce gène, alors que l'administration d'agoniste de l'adénosine (N6-PIA) l'inhibe.

Des souris mutantes knock-out ont été générées pour les récepteurs *Adora* les transporteurs nucléosidiques et enzymes de dégradation de l'adénosine. Cependant, bien que l'absence des récepteurs *ADORA* indépendamment entraîne des défauts au niveau de la physiologie du système nerveux [211, 212], du rein [225] et de l'inflammation [216, 218, 219] chez la souris, aucun effet critique sur le



développement n'a été observé. De même, alors que des études fonctionnelles chez des souris déficientes en Ent1 suggèrent également un rôle de l'adénosine dans le fonctionnement du système nerveux et de la consommation d'alcool, ainsi que dans le fonctionnement rénal [213, 223, 313], aucune anomalie au niveau développemental n'a été observée dans ces différentes études. Les souris knock-out pour le transporteur Ent4 ne présentent pas de phénotype majeur [314]. Enfin, les souris déficientes en Ada ou Adk, présentent une embryogenèse normale, mais développent une lymphopénie sévère (pathologie SCID) [315] et une stéatose hépatique [316], entraînant leur mort précocement après la naissance.

Ces résultats montrent que l'activation anormale de la voie de signalisation de l'adénosine a des conséquences dramatiques sur le développement embryonnaire. Ainsi, la concentration extracellulaire de l'adénosine doit être régulée de manière stricte lors de l'embryogénèse. Ceci est en accord avec les premières données concernant les profils d'expression des différents membres de la voie de signalisation de l'adénosine. L'absence de phénotype chez les souris mutantes pour les récepteurs et les transporteurs pourrait être due à une redondance fonctionnelle de ces protéines. Cependant, aucune étude fine des effets de la perte de l'expression de ces protéines sur l'embryogénèse n'a été réalisée.

L'ensemble de ces données suggère tout de même un rôle de la voie de signalisation de l'adénosine au cours du développement embryonnaire. Les données parcellaires concernant les profils d'expression nécessitent d'être poursuivies d'une manière plus systématique et surtout comparative. Les possibles redondances fonctionnelles, co-localisations de ces acteurs nécessitent d'étudier cette voie de signalisation chez un modèle vertébré simple. Le modèle amphibien *Xenopus leavis* semble être le modèle idéal pour étudier, tout d'abord l'expression des différents acteurs de la voie de signalisation de l'adénosine au cours de l'embryogénèse, puis le rôle de l'adénosine au cours de développement embryonnaire par des méthodes génétiques ou pharmacologiques.

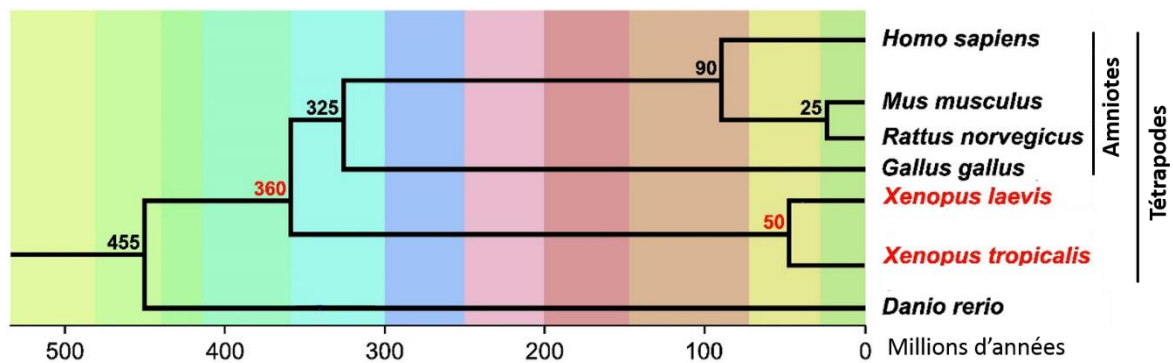


Figure 35: **Relations phylogéniques entre les principaux animaux modèles.** L'ordre de branchement des différentes espèces est indiqué. Le temps est donné en millions d'années. Le point 0 représente le présent. Les différentes couleurs de fond représentent les périodes géologiques (non indiquées). D'après [317].



Figure 36: **Photographies de femelles adultes de *X.tropicalis* (à gauche) et *X. laevis* (à droite).** D'après [Sciencesetavenir.fr](http://Sciencesetavenir.fr)

### III- Le modèle xénope

Les xénopes sont des amphibiens aquatiques anoures, de la famille des *pipidae* et originaires d’Afrique du Sud. Le genre xénope est subdivisé en plusieurs espèces, dont *Xenopus laevis* et *Xenopus tropicalis*. La séparation entre ces deux espèces a eu lieu il y a 50 millions d’années (**figure 35**).

*Xenopus tropicalis* est une espèce diploïde, alors que *Xenopus laevis* a connu une duplication entière de son génome par hybridation de deux espèces parents [318]. Cet évènement de pseudo-tétraploïdisation est estimé datant de 40 millions d’années. Morphologiquement, les deux amphibiens se différencient notamment par leur taille (**figure 36**). Une femelle *Xenopus laevis* mesure environ 10 cm du museau jusqu’au cloaque, alors que la femelle *Xenopus tropicalis* est deux fois plus petite (entre 4 et 5 cm).

#### A. Présentation du modèle *Xenopus laevis*

##### 1. Historique

*Xenopus laevis* a été implanté en Europe par les chercheurs anglais dans les années 1950-1960. Il a tout d’abord été utilisé en médecine comme test de grossesse appelé « *Xenopus test* » ou « test de Hogben » du nom du chercheur qui l’a mis au point. En effet, l’injection d’urine de femme enceinte, contenant des hormones gonadotrophine chorioniques (hCG), dans les sacs lymphatiques d’une femelle xénope entraîne sa ponte le lendemain [319]. Ce test pouvait être réalisé dans trois centres (Watford, Edinburgh et Sheffield), et était entièrement remboursé par le « National Health Service ». En effet, l’utilisation de *X.laevis* a permis le développement des tests de grossesse, effectués au préalable sur des femelles de souris ou lapin, qui nécessitaient la mise à mort de l’animal pour l’observation des ovaires.

Depuis, le xénope est devenu un des modèles vertébrés les plus utilisés en laboratoire permettant l’analyse de nombreux aspect de la biologie. De nombreuses études centrées sur le xénope ont pu en effet démontrer la puissance de ce modèle pour la recherche biomédicale. Hans Spemann, Peter Agre, Tim Hunt et John Gurdon ont obtenu les prix Nobel de physiologie et médecine ou de chimie pour les découvertes du centre d’organisation lors du développement embryonnaire (1935), des régulateurs clés du cycle cellulaire (2001), du rôle des aquaporines (2003) et de la reprogrammation cellulaire (2013), respectivement. De nos jours, *Xenopus laevis* est devenu un modèle pour les pathologies humaines [320-324].



## 2. *Xenopus laevis* dans la nature et au laboratoire

### a) *Génome*

*Xenopus laevis* est une espèce pseudo-tétraploïde. En raison de la redondance fonctionnelle des gènes dupliqués appelés homéologues, il est estimé qu'environ 50 à 75% d'entre eux sont devenus silencieux ou ont été perdus au cours de l'évolution [318]. Les gènes dupliqués restant possèdent aux alentours de 90% d'identité nucléotidiques avec leur homéologue et sont fonctionnels. Les couples de gènes homéologues peuvent avoir un profil d'expression différent et les protéines produites peuvent également avoir des fonctions différentes. Certains homéologues ont connu des dégénérescences de sous-fonctions et doivent être co-exprimés pour permettre une fonctionnalité globale, par complémentarité [325].

Cependant, bien que le génome de *Xenopus laevis* ne soit pas encore entièrement séquencé et assemblé, de très nombreuses informations sont disponibles dans les banques de données et regroupées sur une plateforme appelée Xenbase (<http://www.xenbase.org>) [326, 327].

### b) *Fécondation et ponte*

Dans la nature, la fécondation de *Xenopus laevis* est externe. Au moment de la reproduction, le mâle s'accroche sur le dos de la femelle grâce à des callosités (épaississements épidermiques pigmentés et kératinisés) présentes à la surface interne de ses membres antérieurs. Il malaxe le ventre de la femelle tout au long de l'accouplement, afin de faire sortir des ovocytes qu'il arrose directement de sperme.

Au laboratoire, la fécondation peut se faire de manière artificielle par l'expérimentateur au moment où il le souhaite [328, 329]. En effet, la ponte d'ovocytes est déclenchée par injection d'hCG dans les sacs lymphatiques de la femelle. Puis, la fécondation est effectuée manuellement en recouvrant les ovocytes de sperme, grâce à un testicule de xénope mâle fraîchement prélevé. La fécondation *in vitro* permet un développement synchrone des embryons, ce qui n'est pas le cas après une reproduction naturelle.

A chaque ponte, une femelle peut produire plusieurs milliers d'ovocytes mesurant en moyenne 1,4 mm de diamètre [317]. Leur grande taille, ainsi que celles des embryons les rend facilement manipulables et observables à la loupe binoculaire.



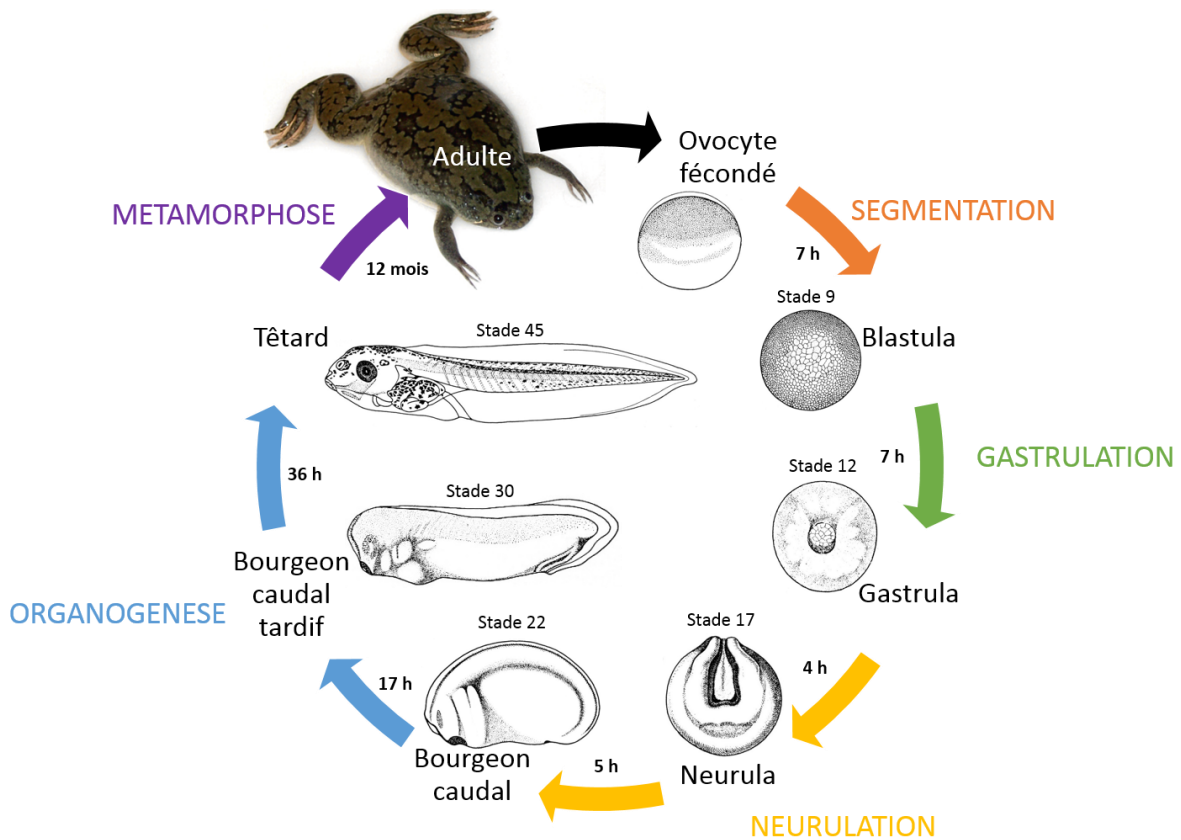


Figure 37: Le cycle de développement embryonnaire de *Xenopus laevis*. Les différentes étapes du développement embryonnaire sont représentées par des couleurs différentes et leurs durées approximatives à 23°C sont indiquées. Les schémas d'embryons sont issus des tables de Nieuwkoop et Faber [330].

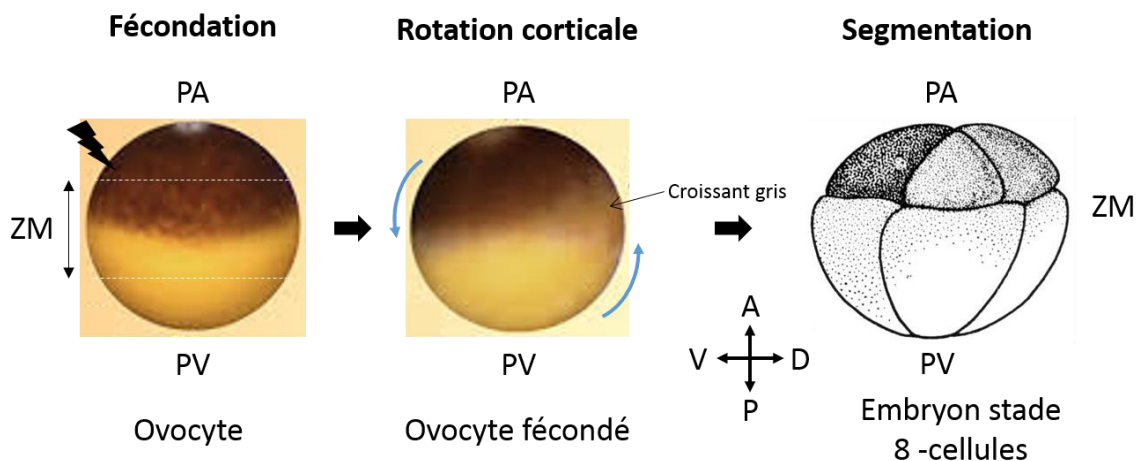


Figure 38: Acquisition des axes de polarité chez le xénope. L'éclair représente le point d'entrée du spermatozoïde dans l'ovocyte lors de la fécondation, déterminant le futur côté ventral de l'embryon. Les flèches bleues représentent le sens de la rotation corticale, entraînant la formation du croissant gris du côté ventral. Les axes de l'embryon sont représentés. A : antérieur ; D : dorsal ; P : postérieur ; PA : pôle animal ; PV : pôle végétatif ; V : ventral ; ZM : zone marginale. D'après snf.jussieu.fr et Xenbase.

### c) *Cycle de développement*

#### (1) Général

Le cycle de développement embryonnaire de *Xenopus laevis* est très court (**figure 37**), ce qui permet d'obtenir des résultats rapidement. Les quatre premières étapes (segmentation, gastrulation, neurulation et organogenèse) permettent d'obtenir un embryon autonome en environ quatre jours à 23°C. Ces phases sont également présentes chez tous les Vertébrés. Cependant, le développement de *Xenopus laevis* est indirect car il présente une étape supplémentaire de métamorphose permettant la dégénérescence de la queue de l'embryon et la croissance des quatre membres du crapaud adulte. Ces changements morphologiques externes sont également accompagnés de modifications internes et sont sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien.

De plus, la durée du cycle de développement embryonnaire est température-dépendante chez *Xenopus laevis*. Cette propriété permet à l'expérimentateur d'adapter la durée du cycle embryonnaire, ou de certaines phases, pour mieux appréhender certains stades embryonnaires. Le cycle sera d'autant plus long que l'environnement aquatique de l'embryon sera froid. Par exemple, à 23°C, la durée du cycle de développement est d'environ quatre jours, alors qu'à 14°C, un embryon atteindra la fin d'organogenèse en quatre fois plus de temps.

#### (2) Segmentation

L'ovocyte de *Xenopus laevis* est une cellule polarisée, avec une pigmentation plus importante du côté du pôle animal que du pôle végétatif (**figure 38**). Cet axe correspond au futur axe antéro-postérieur. La taille importante de l'ovocyte s'explique par les phases de croissance et de vitellogénèse, qui permettent l'accumulation de vitellus au pôle végétatif de l'ovocyte. Le vitellus constituera les nutriments de l'embryon tout au long de l'embryogenèse. Sa composition riche en lipides est plus dense que le cytoplasme. La fécondation va entraîner deux rotations successives de l'œuf. La première est la rotation d'équilibration. Elle s'effectue dix minutes après la fécondation et est une conséquence de l'exocytose des granules corticaux localisés sous la membrane de l'ovocyte. Ceci permet de former l'espace périvitellin et de « libérer » l'œuf de sa membrane vitelline, lui permettant de se retourner en fonction de la gravité. Le pôle animal se trouve alors orienté vers le haut. La seconde rotation est la rotation corticale, qui a lieu environ une demi-heure après la fécondation. Le cytoplasme de l'œuf va se réorganiser et le cytoplasme cortical, le plus externe, va se déplacer sur le cytoplasme le plus profond. Cette rotation des pigments corticaux d'environ 40° vers le point d'entrée du spermatozoïde (futur côté ventral) va permettre la formation du croissant gris (**figure 38**). De ce fait, les futurs blastomères du côté dorsal apparaîtront plus clairs. La partie de l'embryon située entre les pôles animal et végétatif est appelée zone marginale.

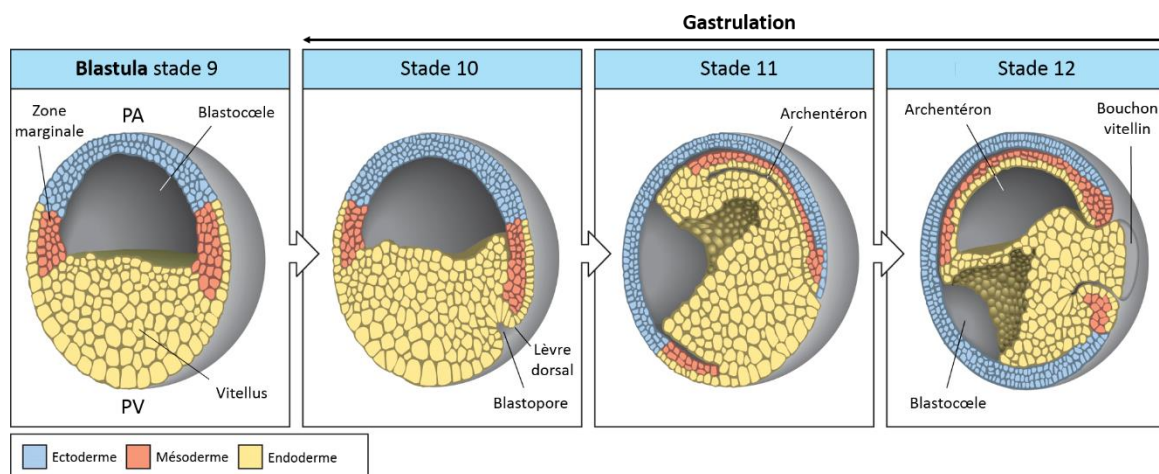


Figure 39: **La gastrulation simplifiée chez *Xenopus laevis***. Les différents stades de la gastrulation sont indiqués. Les trois feuillet embryonnaires sont représentés en couleurs différentes comme indiquées sur le schéma. PA : pôle animal ; PV : pôle végétatif. D'après [www.mun.ca](http://www.mun.ca).

La première division se produit environ une heure et demi post-fécondation et détermine la symétrie bilatérale de l'embryon. La seconde division détermine l'axe dorso-ventral de l'embryon, puis la troisième division, perpendiculaire aux deux premières au niveau de la zone marginale va déterminer l'axe antérieur-postérieur. Cette division est asymétrique de par la différence de densité vitelline à travers l'embryon. Les blastomères du futur côté antérieur (au pôle animal) sont plus petits que ceux du côté postérieur (au pôle végétatif). De plus, la pigmentation de l'ovocyte étant conservée à travers les divisions, il est aisé de distinguer chaque blastomère : le futur côté antérieur de l'embryon est plus pigmenté que le côté postérieur et le futur côté ventral est plus pigmenté au niveau du pôle animal que le futur côté dorsal (**figure 38**).

Chez *Xenopus laevis*, le devenir de chaque blastomère est connu [331], ce qui permet de cibler un organe ou un tissu précis lors des expériences fonctionnelles. Le devenir des différents blastomères seront représentés dans la partie C-1-b.

A la fin de la segmentation (stade 8-9), l'embryon a atteint le stade blastula, composé de 6000 à 10 000 blastomères (**figure 37**) et caractérisé par une cavité appelée le blastocœle. Le volume de l'embryon à ce stade étant le même que celui de l'ovocyte, les divisions de mitose ont permis de former des blastomères de plus en plus petits. De plus, il est aisé de disséquer les couches cellulaires au pôle animal formant le plafond du blastocœle, afin de réaliser les expériences de calotte animale (voir le paragraphe C-2 et **figure 42**). De plus, c'est également à ce stade que s'effectue la transition mid-blastuléenne, caractérisée par la reprise de la transcription, à savoir celle des gènes zygotiques. Avant cette transition, l'embryon vit sur la réserve des ARNm maternels, emmagasinés lors de l'ovogénèse.

### (3) Gastrulation

Grâce à différents mouvements morphogénétiques, la gastrulation permet la formation des trois feuillets embryonnaires : ectoderme, mésoderme et endoderme (**figure 39**). La gastrulation débute par un mouvement d'invagination de quelques cellules endodermiques dorsales de l'embryon, faisant apparaître le blastopore (**figure 39**). La partie située dans la partie antérieure du blastopore est appelée la lèvre dorsale blastoporale. Puis, les cellules mésodermiques sont tractées à l'intérieur de l'embryon par migration sur la matrice extracellulaire le long du toit du blastocœle. En même temps, une cavité appelée archentéron prend la place du blastocœle, jusqu'à le faire totalement disparaître aux termes de la gastrulation.

A la fin de la gastrulation, l'embryon a atteint le stade gastrula – bouchon vitellin (stade 12,5). L'embryon est tridermique : l'ectoderme forme les couches externes de l'embryon, l'intérieur de l'embryon est constitué d'endoderme et de l'archentéron (future lumière du tube digestif) et le mésoderme situé entre ces deux tissus.

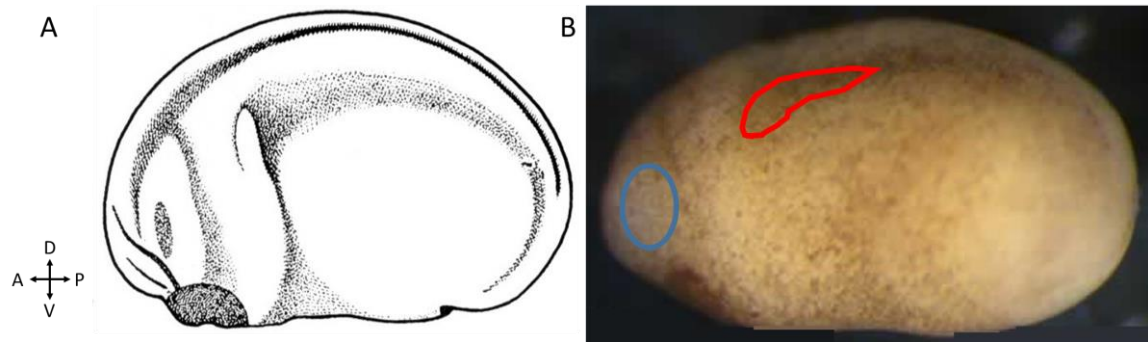


Figure 40: **Embryon de *Xenopus laevis* en fin d'organogenèse (stade 22)**. (A) Schéma (tables de Nieuwkoop et Faber [330]) (B) Photo (Xenbase). Le champ morphogénétique de l'œil est entouré en bleu et celui du rein en rouge. Les axes de l'embryon sont indiqués. A : antérieur, D : dorsal, P : postérieur et V : ventral.

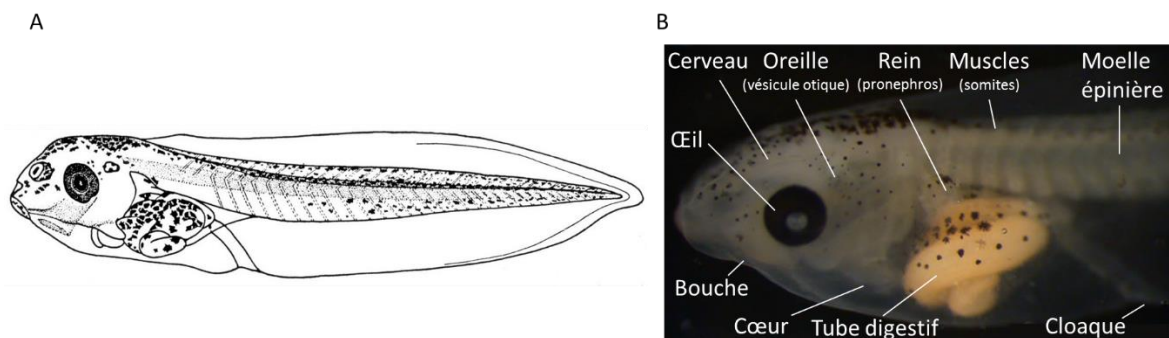


Figure 41: **Embryon de *Xenopus laevis* en fin d'organogenèse (stade 45)**. (A) Schéma d'un embryon entier (tables de Nieuwkoop et Faber [330]) (B) Photo de la partie antérieure de l'embryon (Xenbase). Les organes principaux sont indiqués.

#### (4) Neurulation

La neurulation permet la mise en place du système nerveux. Le neuroectoderme va se refermer sur lui-même pour former le tube neural et se séparer progressivement de l'épiderme. De plus, le mésoderme va s'individualiser pour constituer la chorde, les somites et les pièces intermédiaires (futur rein primitif). L'endoderme va se refermer autour de l'archentéron qui va former la future lumière du tube digestif.

A la fin de la neurulation, l'embryon a atteint le stade bourgeon caudal (stade 22) (**figure 40**). Un massif mésodermique dans la région postérieure forme la future queue. Du côté antérieur, au niveau de l'encéphale, on distingue le champ morphogénétique de l'œil.

#### (5) Organogenèse

L'organogenèse permet la différenciation et la mise en place des organes afin qu'ils deviennent fonctionnels (**figure 41**). Cette étape se termine au stade 45, où l'embryon a épuisé l'intégralité de ses réserves vitellines et doit donc se nourrir de manière autonome, le système digestif étant le dernier à se mettre en place. L'embryon est appelé têtard et mesure entre 8 et 10 mm de long.

#### (6) Métamorphose et croissance

L'organogenèse laisse place à l'étape de la métamorphose, où la partie caudale de l'embryon va dégénérer et ses membres postérieurs et inférieurs vont croître. Cette phase, au cours de laquelle le têtard deviendra un crapaud miniature (10 mm du museau au cloaque), dure environ deux mois. Il faudra ensuite six à huit mois supplémentaires de croissance pour que le crapaud atteigne sa taille adulte et la maturité sexuelle.

### **B. Les avantages du modèle *Xenopus laevis* :**

#### **1. Par rapport à *Xenopus tropicalis***

Le modèle *Xenopus tropicalis* est également utilisé en laboratoire car son génome est totalement séquencé depuis 2011 [332]. En effet, par opposition à *Xenopus laevis* qui est pseudo-tétraploïde, *Xenopus tropicalis* est diploïde et l'étude de son génome a pu être effectuée plus rapidement. Cependant, bien que la pseudo-tétraploïdie de *Xenopus laevis* apparaisse comme un inconvénient pour l'analyse génomique, elle peut être un avantage pour étudier l'évolution des gènes ancestraux.

Les embryons de *Xenopus tropicalis* sont plus sensibles aux changements de température lors du développement et celle-ci doit être aux alentours de 25°C [333]. De part cette température standard élevée, les embryons de *Xenopus tropicalis* se développent plus rapidement [330].



Leur cycle est environ 50% plus court que celui de *Xenopus laevis*, permettant au *X.tropicalis* d'atteindre l'âge adulte plus tôt (trois à cinq mois). Cependant, lors des études embryologiques, cette propriété est également un inconvénient pour obtenir les différents stades embryonnaires.

Enfin, comme les adultes, les ovocytes et les embryons de *X.laevis* sont proportionnellement plus grands que ceux de *X.tropicalis* [317]. Les ovocytes mesurent environ 0,8 mm de diamètre et les têtards 4 mm en fin d'organogenèse. Bien que ces derniers soient également visibles sous la loupe binoculaire, les expérimentations et les observations demeurent plus délicates chez cette espèce.

## 2. Par rapport au poisson zèbre

Le poisson zèbre est le deuxième modèle vertébré utilisé en biologie développementale pour étudier la formation de nombreux organes. La transparence des embryons tout au long du développement est un avantage pour l'observation directe des différents tissus.

Cependant, bien que le poisson zèbre soit un vertébré, il présente plus de différences au niveau génomique et protéique que le xénope avec les mammifères (**figure 35**)

De plus, son cycle de développement est beaucoup plus court que celui du xénope (48h), limitant l'accessibilité à tous les stades de développement [295]. Les ovocytes et embryons du poisson zèbre sont plus petits que ceux de *X.laevis* (0,7 mm de diamètre pour les ovocytes et 4 mm pour les embryons en fin d'organogenèse). Ces caractéristiques rendent les observations plus aisées chez *X.laevis* que chez le poisson zèbre [317].

Enfin, contrairement au xénope, les cellules du poisson zèbre ne peuvent pas être ciblées lors des expériences de perte et gain de fonction (voir paragraphe C-4). En effet, après les premières divisions, la répartition du cytoplasme est inégale et les blastomères restent interconnectés par des ponts cytoplasmiques. Ceci est un inconvénient majeur de ce modèle, ne permettant pas d'avoir un contrôle interne comme chez *X.laevis*.

## 3. Par rapport aux mammifères

Les modèles mammifères, notamment la souris, ont été les modèles génétiques de référence pour appréhender les fonctions de nouveaux gènes et surtout pour servir de modèles animaux pour les maladies humaines. Cependant, le modèle xénope possède de nombreux avantages par rapport aux rongeurs.

Tout d'abord, le développement embryonnaire externe de *Xenopus laevis* simplifie les manipulations et permet de ne pas sacrifier la femelle en gestation pour prélever les embryons, comme



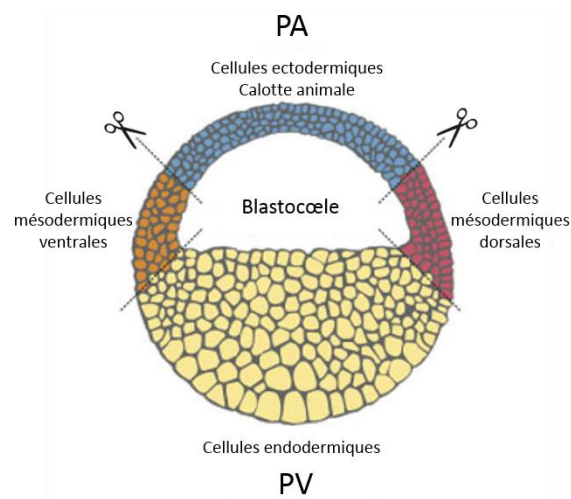


Figure 42: **Représentation schématique d'une blastula de *Xenopus laevis* en coupe transversale (stade 9).** Chaque couleur représente un groupe de cellules dont l'origine est indiquée. Les ciseaux indiquent la partie à sectionner pour obtenir une calotte animale. D'après [www.mun.ca](http://www.mun.ca)

c'est le cas pour les modèles murins. De plus, le cycle embryonnaire est plus long chez la souris : un embryon de *X.laevis* en fin d'organogenèse est obtenu après environ quatre jours, alors qu'un embryon de souris atteint le même stade embryonnaire en 18 à 21 jours [295]. Enfin, le nombre d'embryons par portée est limité, par exemple huit à dix embryons chez la souris C57Bl6.

## **C. Les outils développés chez *Xenopus laevis* pour étudier les fonctions des gènes**

### **1. Les ovocytes et leurs utilisations en biologie**

Les ovocytes de xénope constituent une énorme machinerie cellulaire, notamment par la taille de leur noyau (ou vésicule germinative), leur richesse en ADN mitochondrial et de l'amplification de l'ADN ribosomal [334]. De ce fait, ils peuvent être utilisés pour la production *in vivo* de grandes quantités d'ARNm ou de protéines exogènes à leur site subcellulaire attendu [335]. Ainsi, en sur-exprimant un récepteur ou un canal à la surface cellulaire, ils peuvent servir à étudier sa fonctionnalité par des méthodes de patch-clamp [336-338]. Cette technique a permis de caractériser les fonctions du récepteur adora2b chez le xénope [339].

### **2. Les calottes animales: test ex vivo d'activité biologique d'une protéine**

Au stade blastula (stade 8-9), l'embryon de xénope est constitué d'une fine épaisseur cellulaire au pôle animal, possédant quatre couches de cellules considérées comme pluripotentes, car capables de se différencier en cellules dérivées des trois feuilletts embryonnaires. Elles forment la calotte animale ou animal cap [328]. Cet ensemble de cellules est facilement dissociable du reste de l'embryon, car est situé juste au-dessus du blastocèle laissant un espace entre les cellules du plancher endodermique (**figure 42**).

Ces cellules, cultivées dans un milieu salin, vont se différencier en épiderme. Cependant, lorsque la calotte animale est mise en culture en présence de différents facteurs de croissance, les cellules qui la composent vont se différencier également en divers tissus d'origine neuroectodermique, mésodermique ou endodermique. Le facteur de croissance le plus utilisé est l'activine et selon sa concentration, les cellules de la calotte animale peuvent se différencier en cellules sanguines, musculaires, nerveuses, cartilagineuses, cardiaques ou hépatiques [340]. De plus, si le milieu activine est complété avec un autre facteur de croissance, comme l'acide rétinoïque ou des interleukines, ces cellules peuvent se différencier en tissus pancréatiques, rénaux ou encore en cellules immunitaires.

Il est également possible de faire des greffes de cellules pluripotentes dans l'embryon ou des expériences de sandwichs pour utiliser les propriétés d'induction des différents tissus dans la

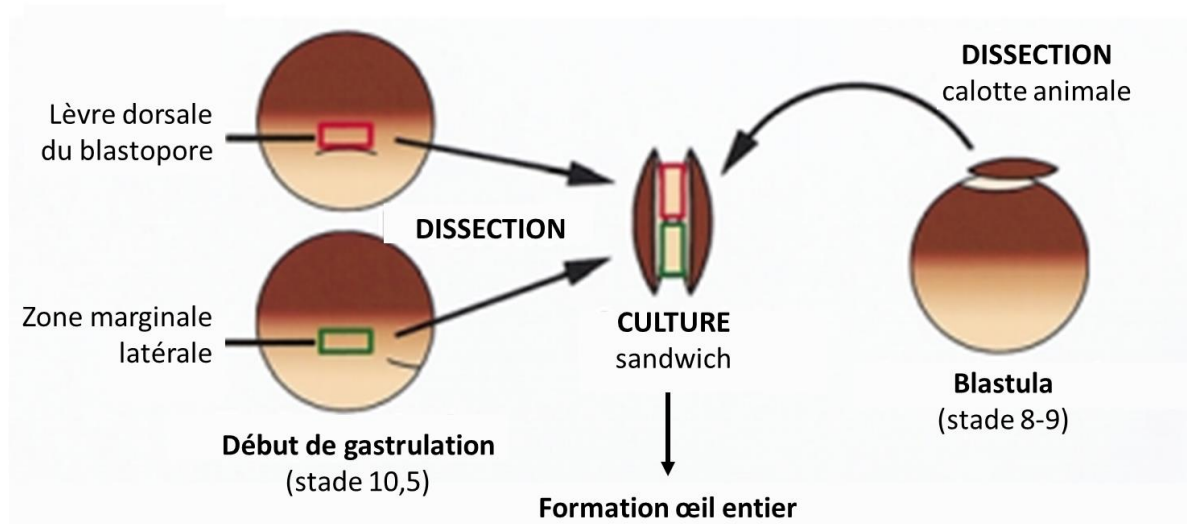


Figure 43: **Schéma d'une expérience des calottes animales en sandwich** permettant la formation d'un œil entier de *Xenopus laevis*. D'après [341].

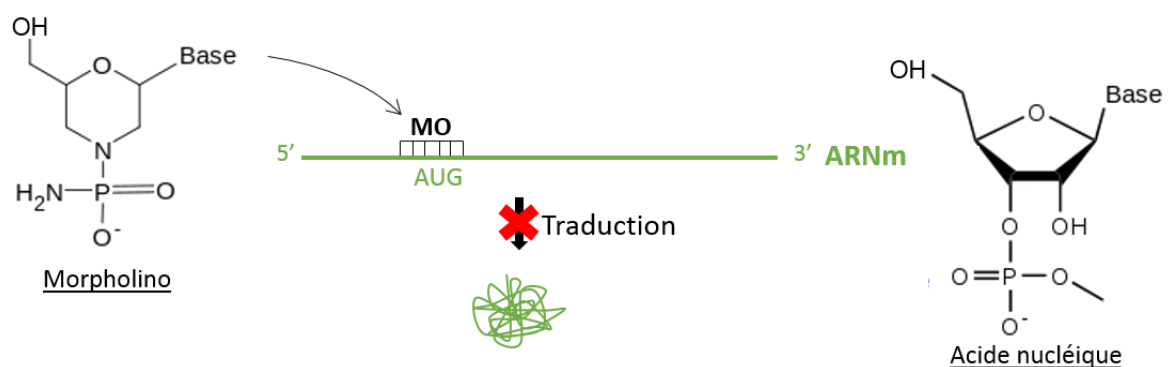


Figure 44: **Principe d'action du morpholino**. Le morpholino, par comparaison aux acides nucléiques composant l'ARNm, possède un cycle morpholine à la place du ribose. L'oligonucléotide morpholino (environ 25 bases) se fixe au niveau du site d'initiation de la traduction de l'ARNm cible par complémentarité et bloque sa traduction en protéine.

différenciation. Cette méthode a été utilisée par exemple pour produire un œil entier de *Xenopus laevis* *in vitro* à partir de deux calottes animales de stade blastula entourant deux zones microdisséquées d'un embryon en début de gastrulation [341] (**figure 43**). La lèvre dorsale du blastopore permet d'induire la formation de la partie antérieure de l'œil, alors que la zone marginale latérale la formation de sa partie postérieure.

### 3. Criblages génétiques par des approches de “forward genetics”

Ce genre de criblage basé sur la mutagenèse aléatoire a été largement utilisé en biologie du développement, notamment chez la drosophile et a permis l'identification d'un grand nombre de gènes développementaux [342]. Elle repose sur la sélection d'embryons présentant des phénotypes aberrants et a permis l'obtention de mutants chez *X.tropicalis* [343]. Ces mutations peuvent être causées chimiquement, par exemple par utilisation de l'agent mutagène ENU (N-nitroso-N-éthylurée). Il existe également des approches de mutagenèse insertionnelle utilisant la stratégie des transposons comme Tol2 [344, 345]. Ces techniques ont permis d'étudier la fonction de certains gènes chez le xénope, mais elles restent aléatoires et demandent de très nombreuses étapes de sélection.

Il est également possible d'effectuer des criblages pharmacologiques en mettant simplement en culture des embryons en présence d'une substance chimique à tester [346]. Cette approche repose sur le type de phénotype recherché : plus le phénotype est simple à analyser, plus le criblage est facile, rapide et efficace. Par exemple, des changements de la pigmentation de la peau, des altérations de l'asymétrie gauche/droite testables par observation de l'enroulement du cœur ou de l'intestin, des défauts de l'angiogénèse conduisant à la formation d'œdèmes ont été analysés par ce genre de criblages [311, 347, 348]. Entre autres, un antagoniste de récepteur adora a été identifié comme composé anti-angiogénique [311].

### 4. Modifications de l'expression de gènes : Surexpression ou knock-down

Grâce à la grande taille et à la robustesse de ses embryons, le xénope est un modèle de choix pour les expériences de perte et gain de fonction [349].

En effet, il est possible de sur-exprimer un ou plusieurs gènes d'intérêt en micro-injectant des ARNm ou de l'ADN directement dans une cellule de l'embryon. Des injections de protéines ou d'anticorps sont également possibles. Pour inhiber l'expression de gènes, des micro-injections d'oligonucléotides de type morpholino (MO) (**figure 44**) sont plus couramment réalisées [350-352]. Le morpholino, en se fixant sur l'ARNm par complémentarité, bloque la traduction protéique ou l'épissage de ce dernier, par encombrement stérique. Chez *Xenopus laevis*, l'extinction de gènes par la méthode des ARNi n'est pas possible car les amphibiens ne possèdent pas le gène Argonaute, nécessaire au

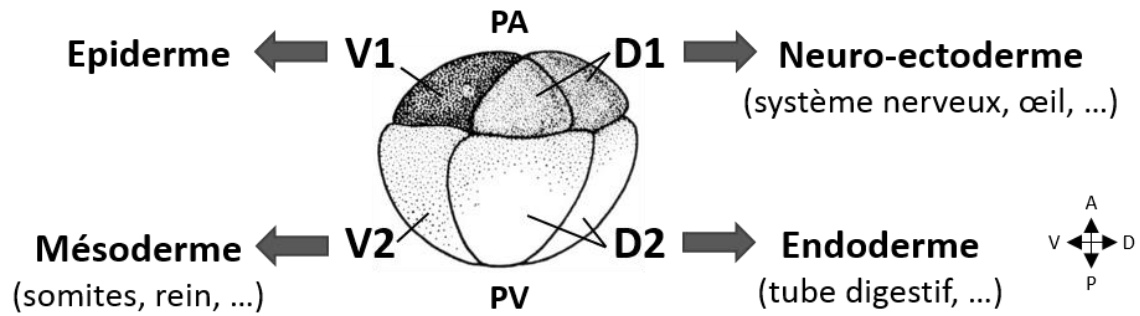


Figure 45: **Devenir des cellules d'embryon de xénope au stade 8-cellules.** L'embryon est divisé en 8 blastomères: 2 blastomères V1 (ventral-anérieur), 2 blastomères V2 (ventral-postérieur) (pour ces deux types de blastomères, un seul est visible ici), 2 blastomères D1 (dorsal-anérieur) et 2 blastomères D2 (dorsal-postérieur). Le devenir de chaque blastomère est indiqué. PA : Pôle Animal ; PV : Pôle Végétatif. Axes : Antérieur (A), Postérieur (P), Dorsal (D) et Ventral (V). D'après les tables de Nieuwkoop et Faber [330].

recyclage des ARNm ciblés [353].

Le devenir de chaque cellule ou blastomère étant connu (**figure 45**), il est possible de cibler un organe ou une région précise dès le stade 2 cellules [354]. La symétrie bilatérale de l'embryon est un atout car le côté non ciblé constitue un contrôle négatif interne.

## 5. Perturbations génomiques par transgénèse

Plusieurs techniques de transgénèse ont été développées chez le xénope mais celle mise en place dans le laboratoire d'E. Amaya reste la plus utilisée. Cette technique a été mise au point en 1996 et repose sur la transplantation d'un noyau de spermatozoïde transgénique dans un ovule non fécondé [355]. Avant cela, un plasmide linéarisé contenant la cassette d'intérêt est intégré dans l'ADN du spermatozoïde grâce à des enzymes de restriction (REMI). Les embryons transgéniques peuvent être utilisés pour tester des promoteurs grâce à l'utilisation d'un gène rapporteur tel que la GFP, pour surexprimer un gène d'intérêt sauvage ou muté sous le contrôle d'un promoteur tissu-spécifique [356]. L'embryon produit alors des protéines dominantes-négatives dans l'organe ou le tissu choisi. Cette méthode permet d'étudier le rôle de certains gènes, ainsi que l'impact de certaines mutations, impliquées dans des pathologies humaines et de générer des animaux modèles pour ces maladies [357]. Néanmoins, cette technique reste très laborieuse et peu efficace.

## 6. Mutagenèse dirigée

Les nouvelles méthodes de mutagenèse dirigée sont plus efficaces que la mutagenèse aléatoire et sont des alternatives stables à la stratégie MO, dont l'effet se dilue au fil des divisions cellulaires, car elles ciblent directement l'ADN génomique. Elles permettent ainsi de générer rapidement des adultes mutants, ce qui facilite les études fonctionnelles.

La méthode Zinc-Finger nucleases (ZFNs) a été la première technique mise en place [358]. Elle est basée sur l'utilisation d'une nucléase (dérivée de FokI) fusionnée à un site de reconnaissance spécifique de l'ADN ciblé, composé de 3 à 6 domaines doigt de zinc [359]. La dimérisation de deux nucléases autour de la séquence nucléique d'intérêt entraîne une cassure double-brin qui sera réparée de manière plus ou moins efficace par la machinerie cellulaire, permettant ainsi des mutations ciblées. Celles-ci pourront être transmises aux générations F1. Cependant, l'efficacité de mutation est faible (15 à 17%) avec une forte cytotoxicité, le « design » du domaine de reconnaissance ADN spécifique est laborieux, et tous les gènes ne peuvent pas être ciblés [317].

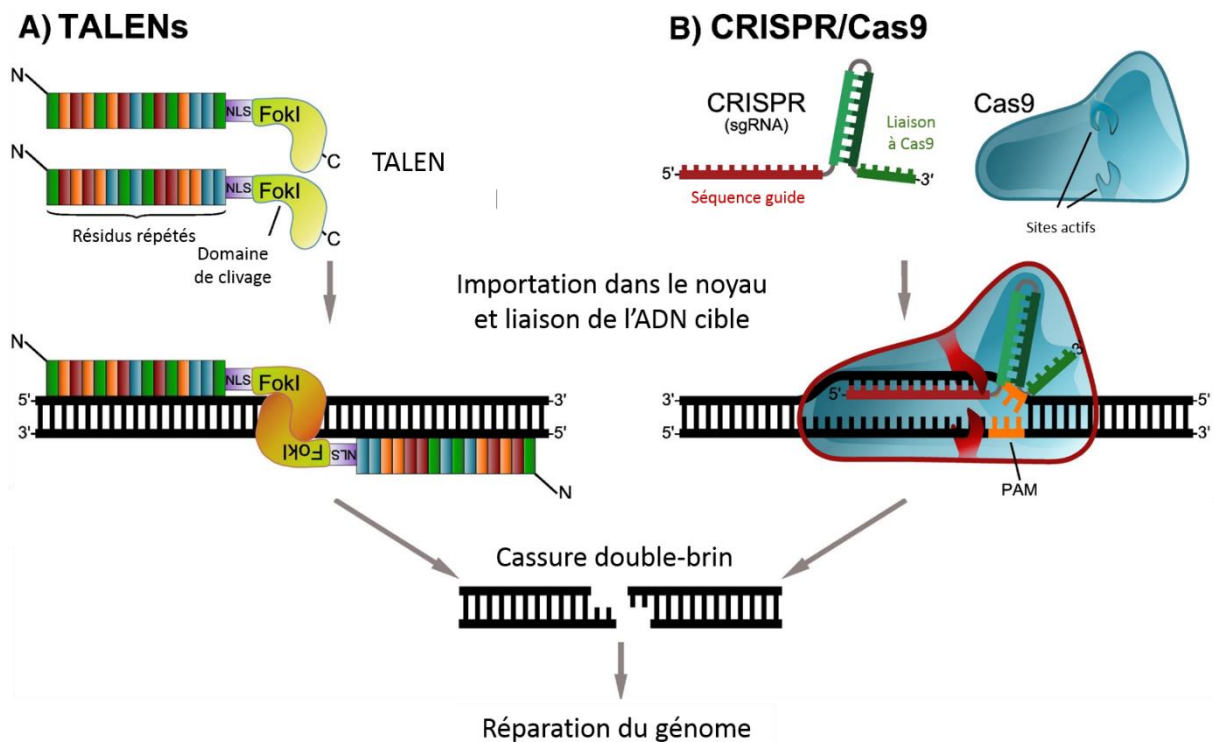


Figure 46: Deux méthodes de mutagenèse dirigée : TALEN (A) et CRISPR/Cas9 (B). D'après [317].

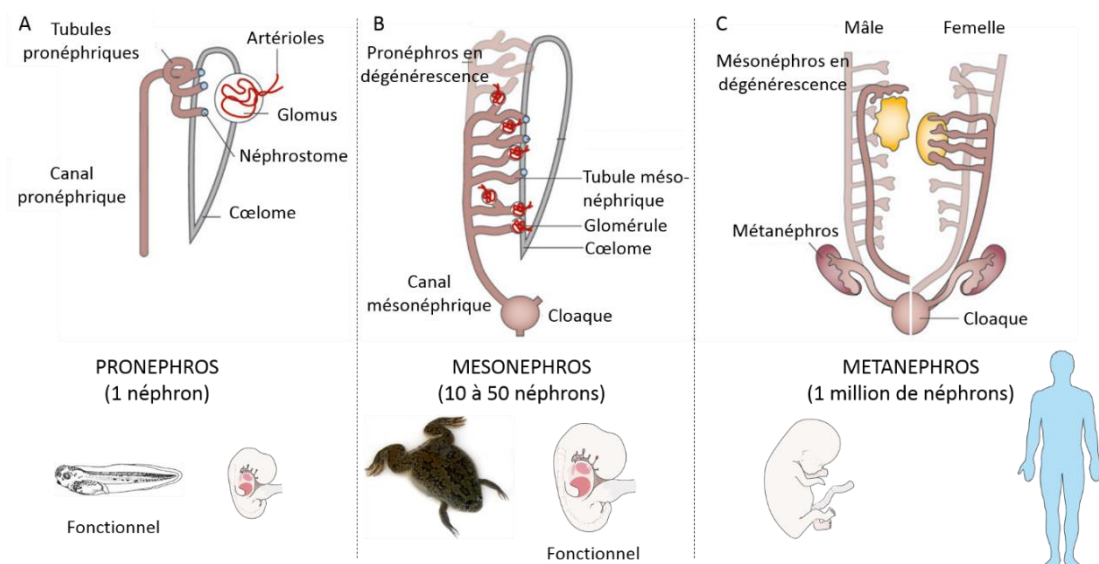


Figure 47: Différents reins se succèdent au cours du développement embryonnaire. (A) Le pronephros est constitué de tubules et d'un canal, ainsi que d'un glomus fixé au cœlome. Il est fonctionnel chez l'embryon de xénope, mais pas de mammifère. (B) Le mésonéphros se forme en même temps que le pronephros dégénère. Il est constitué de 10 à 50 néphrons formés chacun d'un glomérule et d'un tubule, et reliés entre eux par un canal. Il représente le rein adulte chez le xénope et le premier rein embryonnaire fonctionnel chez les mammifères. (C) Le métanéphros se forme chez les mammifères lors de la dégénérescence du mésonéphros. Il est composé d'un million de néphrons et constitue le deuxième rein embryonnaire fonctionnel et le rein adulte. D'après [360].

Pour pallier à cela, depuis 2012, une technique de mutagenèse dirigée plus efficace est utilisée chez l'amphibien : la stratégie TALEN, pour Transcription Activator-like Effector Nuclease [361] (**figure 46**). Une nuclease de type FokI est également couplée à un domaine de reconnaissance à l'ADN, mais ce dernier est plus simple à « designer ». Il est composé d'un nombre variable de répétition d'acide-aminés, chacun capable de reconnaître un nucléotide d'ADN spécifique. Une séquence NLS (Nuclear Localization Sequence) fait le lien entre le site de liaison à l'ADN et la nucléase, afin d'envoyer le TALEN dans le noyau. Comme pour les ZFNs, la dimérisation des nucléases TALENs entraîne une cassure double-brin qui sera réparée par la machinerie cellulaire. Le taux de mutation associé à cette méthode est de 80 à 90 % [362, 363].

Bien que la stratégie TALEN devienne populaire, une nouvelle technologie se développe, s'appuyant sur le système immunitaire adaptatif des bactéries. Il s'agit de la stratégie CRISPR/Cas, basée sur l'utilisation d'un ARN guide simple brin (ARNsg) de 100 nucléotides et de l'endonuclease Cas9 [364] (**figure 46**). L'ARNsg est composé de 20 nucléotides pouvant cibler une séquence spécifique d'ADN qui doit être suivie d'une séquence PAM (*Protospacer Adjacent Motif*) conservée et de 80 nucléotides formant une boucle pour le recrutement de la protéine Cas9. Cette endonuclease contient deux domaines nucléases séparés, chacun responsable du clivage d'un brin d'ADN ciblé. La réparation du génome se fait ensuite comme pour les stratégies ZFN et TALEN. L'utilisation de cette méthode est efficace sur le génome de *X.tropicalis*, mais, à ce jour, elle reste à démontrer chez *Xenopus laevis* [365]. Elle présente l'avantage d'être plus précise que les autres méthodes et ne nécessite le design que d'un seul site de reconnaissance à l'ADN [366]. Elle n'est pas limitée par la nécessité de la séquence PAM (motif NGG pour Cas9), car cette dernière est présente en moyenne tous les 8-12 nucléotides sur le génome humain.

#### **D. Modèle d'étude pour l'embryogenèse**

De par ses avantages et les différents outils décrits précédemment, *Xenopus laevis* est un modèle d'étude simple et puissant pour étudier l'embryogenèse et décrypter les différents mécanismes moléculaires la régulant. Ainsi, ce modèle a permis de mettre en évidence le rôle des différentes voies de signalisation impliquées dans les phases précoces du développement embryonnaires [367-369]. Mais ce modèle a également permis de comprendre les mécanismes moléculaires régulant la phase d'organogénèse et l'implication des différentes voies de signalisation dans la mise en place des organes tels que le cœur, le pancréas, le foie [370-372]. En particulier, *X.laevis* est devenu un modèle d'étude pour la formation du rein, dont les étapes de son développement sont très bien détaillées et connues [373, 374]. Enfin, de nombreuses recherches portant sur la formation de l'œil et la différenciation cellulaire au sein de la rétine utilisent *X.laevis* comme modèle [375-378]. En effet, la formation et la fonctionnalité de ces organes sont facilement analysables chez



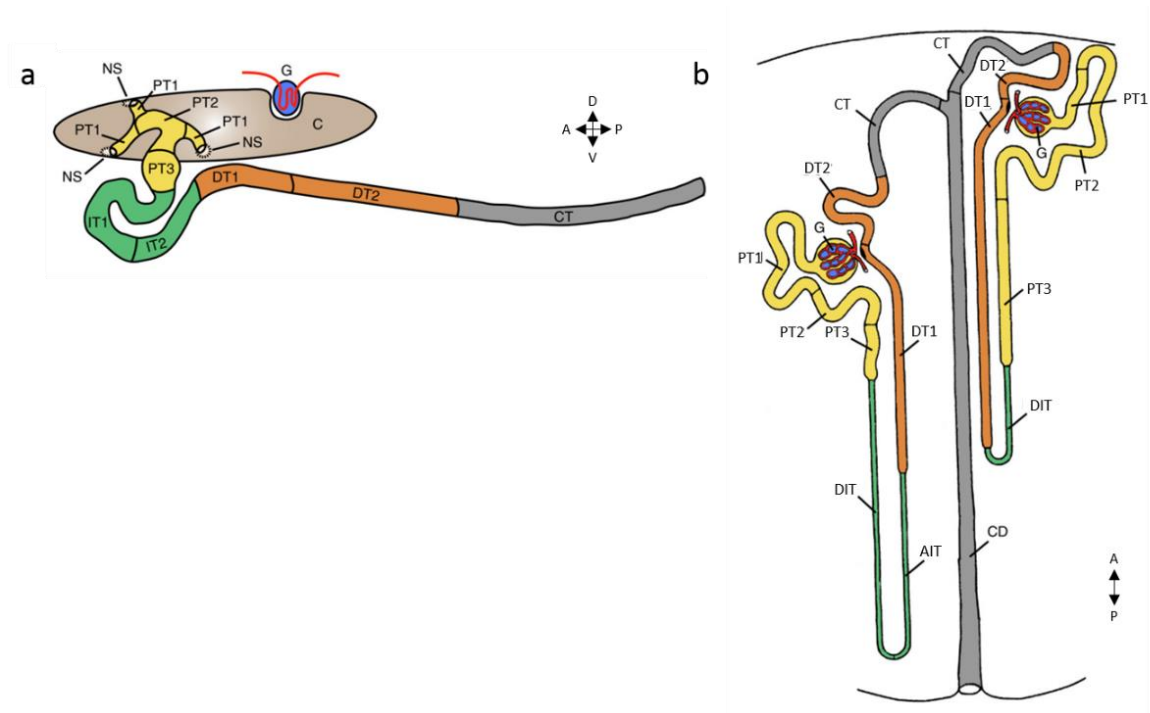


Figure 48: **Comparaison entre les différents segments du pronephron et du métanéphron.** Représentation schématique d'un rein pronephrique de xénope (stade 35/36) (a) et de reins métanéphriques de mammifère (b), boucle longue (gauche) ou courte (droite). Chaque segment est représenté par une couleur différente : en jaune les tubules proximaux (PT), en vert les tubules intermédiaires (IT, DIT pour Descendant et AIT pour Ascendant), en orange les tubules distaux (DT) et en gris les tubules connecteurs (CT), reliés par le canal collecteur (CD) dans le rein métanéphrique (b). Les néphrostomes (NS ; (a)) font le lien entre la cavité cœlomique (C ; en marron) et le pronephron. Le glomus (G) est représenté en bleu avec les vaisseaux sanguins associés en rouge. Axes : Antérieur (A), Postérieur (P), Dorsal (D) et Ventral (V). Adapté de [379].

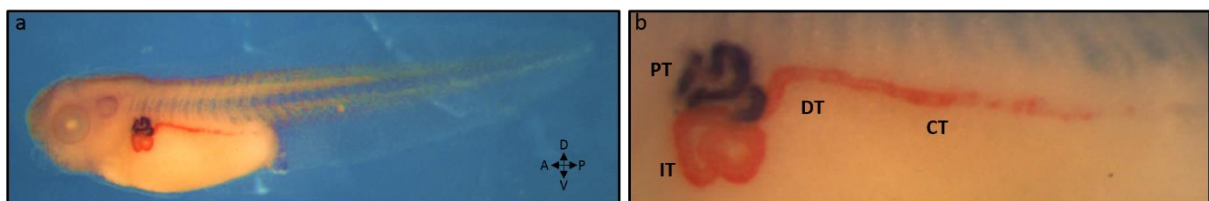


Figure 49: **Marquage rénal d'un embryon de *Xenopus laevis*** par immunohistochimie 3G8/4A6. Embryon entier dépigmenté au stade 41 (a) et zoom sur le rein droit (b). Les tubules proximaux (PT) sont révélés en violet (3G8) et les tubules intermédiaires (IT), distaux (DT) et connecteur (CT) en rouge (4A6). Les axes de l'embryon sont représentés. A: antérieur, D: dorsal, P: postérieur, V: ventral.

le têtard et les résultats obtenus peuvent être transposés aux mammifères. Leurs étapes de formation seront détaillées dans la deuxième partie-I-A et B.

#### a) *Le rein*

*Xenopus laevis* est un modèle d'étude idéal pour la pronephrogenèse car chez les xénopes, le rein embryonnaire fonctionnel ou pronephros est constitué d'un seul néphron (**figure 47**) [360]. Le pronephros des mammifères n'est pas fonctionnel, mais est cependant nécessaire à la formation du mésonéphros qui constitue le rein embryonnaire. Ce dernier est composé de plusieurs néphrons et constitue une structure arborescente plus complexe. Chez l'amphibien, le mésonéphros constitue le rein adulte, après dégénérescence du pronephros. Chez les mammifères, un « troisième rein », le métanéphros, se met en place lors de l'embryogenèse. Il est composé d'un million de néphrons et représente le rein adulte.

Malgré les différences structurales des différents reins, l'embryon de xénope permet d'étudier de manière simple la fonctionnalité d'un néphron composé de segments analogues à ceux du rein adulte de mammifères (**figure 48**) [379, 380]. En effet, un néphron est toujours composé de trois sous-unités fonctionnelles. La première est le glomus (ou le glomérule) où s'effectue l'ultrafiltration sanguine artériolaire. La deuxième partie est composée des tubules proximaux (trois segments), intermédiaires (deux segments), puis distaux (deux segments), impliqués dans la réabsorption de l'eau et des molécules présentes dans l'ultrafiltrat. La dernière partie est le tubule connecteur ou le canal permettant l'évacuation des déchets vers le cloaque ou la vessie.

Une différence majeure existe néanmoins entre les néphrons des différents types de rein. Le pronephros est un rein « non intégré ». En effet, l'ultrafiltrat des artérioles produit par le glomus est libéré tout d'abord dans une cavité appelée le coelome (**figure 48a**). Il sera ensuite évacué par trois néphrostomes, faisant le lien avec le tubule proximal. Dans le cas des méso- et métanéphros, chaque unité de filtration est directement liée à un tubule proximal (**figure 48b**). Le néphron est dit « intégré ». De plus, dans le métanéphros, les multiples néphrons sont reliés entre eux au niveau du tubule connecteur par un segment supplémentaire appelé le canal collecteur.

Chez *Xenopus laevis*, le rein est facilement accessible car il est situé directement sous la peau de l'embryon. Les différents marquages rénaux par hybridation *in situ* ou d'immunohistologie sont ainsi aisément analysables (exemple **figure 49**). De plus, tout dysfonctionnement rénal va entraîner la formation d'œdèmes, phénotype simple à observer.

Ce modèle a permis d'étudier les fonctions des différents gènes impliqués dans des pathologies rénales humaines, comme par exemple le gène *WT-1* dont des mutations ont été décrites dans des cas

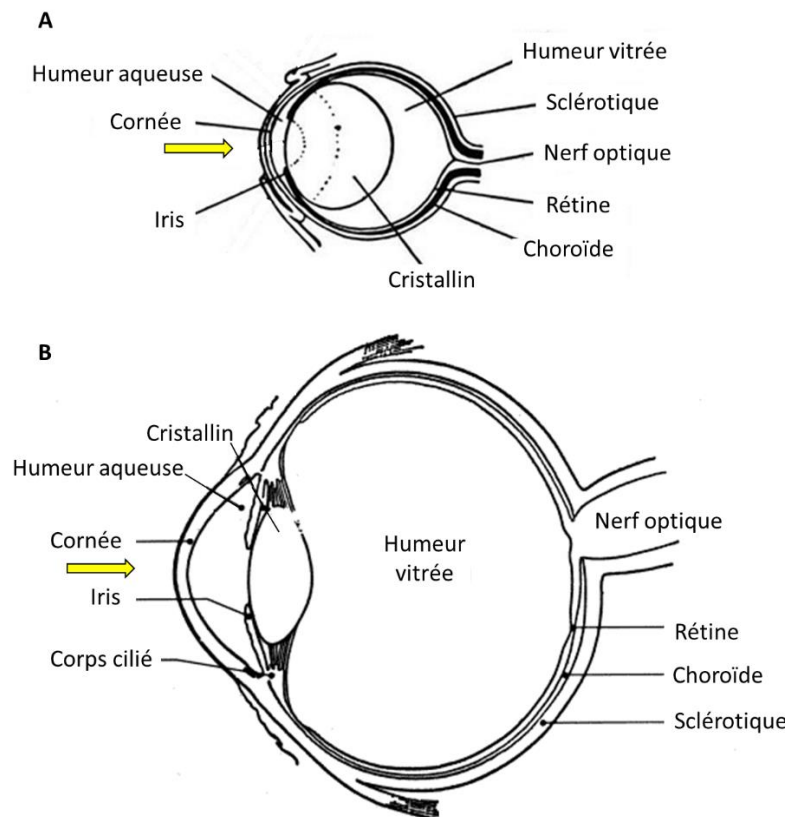


Figure 49: **Structure de l'œil chez le xénope (A) et chez l'homme (B) à l'âge adulte.** La flèche jaune représente l'entrée du signal lumineux. D'après « Developmental Biology Interactive ».

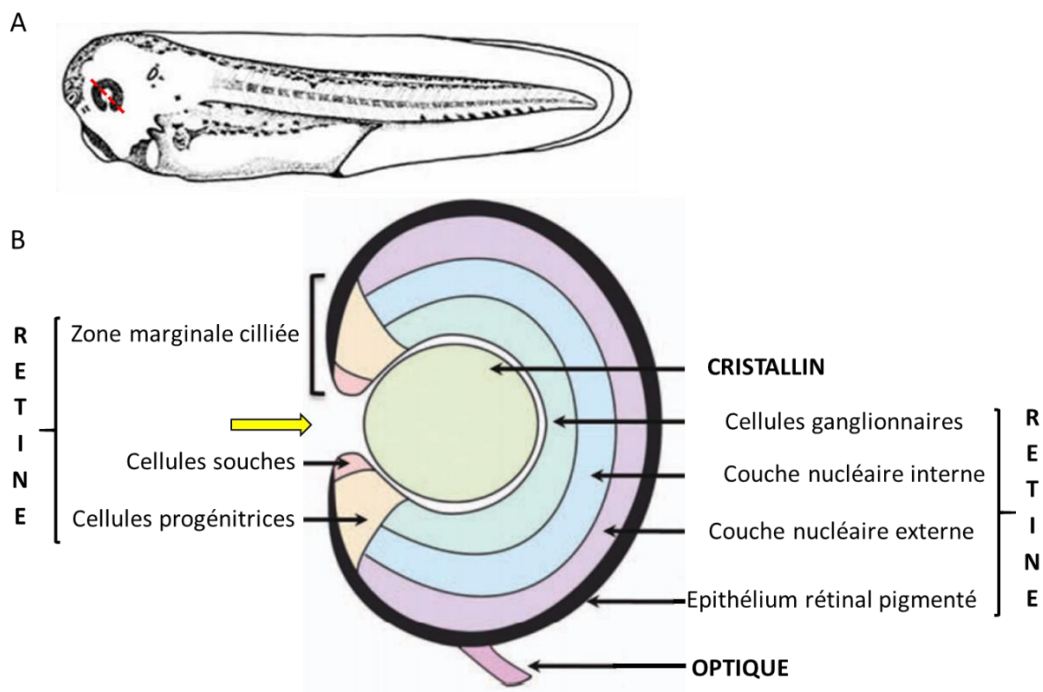


Figure 50: **Structure de l'œil chez l'amphibien en fin d'organogenèse (stade 39).** (A) Schéma d'un embryon de *Xenopus* entier en vue latérale. Le côté antérieur est vers la gauche. Les pointillés rouges représentent la coupe au niveau de l'œil représentée dans le schéma B. La flèche jaune représente l'entrée du signal lumineux. D'après Xenbase (A) et [381] (B).

de tumeurs de Wilm [382], ou les gènes *polycystin 1* et 2 impliqués dans les maladies rénales polykystique (PKD) [383, 384].

Dans ce modèle, il est également possible de produire *ex vivo* un rein ou un segment précis à partir des calottes animales cultivées dans de l'activine (10ng/ml) et de l'acide rétinoïque ( $10^{-4}$  M) [340]. Quand transplanté dans un embryon pronephrectomisé, ce rein produit *ex vivo* est capable de fonctionner *in vivo* [385].

#### b) *L'œil*

*Xenopus laevis* a également servi de modèle d'étude pour explorer le développement de l'œil.

En effet, la structure de l'œil de xénope est comparable à celle de l'homme (**figure 49**). Chez le xénope comme chez les mammifères, l'œil est composé d'un cristallin par lequel pénètre la lumière et d'une rétine composée de plusieurs couches de cellules nerveuses à travers lesquelles l'information lumineuse est transmise au cerveau sous forme de signal électrique. La lumière traverse d'abord la cornée, l'humeur aqueuse et le corps vitré, en plus du cristallin, avant de parvenir à la rétine. L'œil est également structuré par la choroïde et la sclérotique qui constituent une couche solide de protection.

Chez l'amphibien, la rétine est composée de diverses couches cellulaires différenciées : la couche nucléaire externe composée des photorécepteurs, la couche nucléaire interne composée de cellules de Müller, cellules horizontales, cellules bipolaires et d'interneurones et enfin une couche ganglionnaire composée de cellules amacrines et cellules ganglionnaires [381] (**figure 50**). Ce circuit cellulaire est retrouvé chez les mammifères. A la périphérie de la rétine de xénope se trouve la zone marginale ciliaire ou ZMC. A la différence des mammifères, l'œil des amphibiens se développe de manière continue au cours de leur vie [386]. Ainsi, la majorité des cellules rétinienne d'un œil adulte est formée après la période embryonnaire, à partir de cette ZMC. L'injection de BrdU a en effet permis de démontrer que les cellules la constituant étaient capables de se renouveler, mais aussi de se différencier dans tous les types de cellules rétinienne, propriétés caractéristiques de cellules souches [377].

Quatre zones caractérisées par des états de différenciation cellulaire différents (cellules souches, rétinoblastes, et précurseurs indifférenciés et différenciés) ont été identifiées au sein de la ZMC [387]. Ce gradient spatial correspond au gradient temporel de la cascade génique de la formation embryonnaire de la rétine (**figure 51**).

Cette zone retrouvée chez les mammifères entre l'épithélium rétinale pigmenté et l'iris, sous le nom de corps ciliaire, contient seulement une très petite quantité de cellules présentant des caractéristiques de cellules souches *in vitro* (**figure 52**) [377, 388, 389].

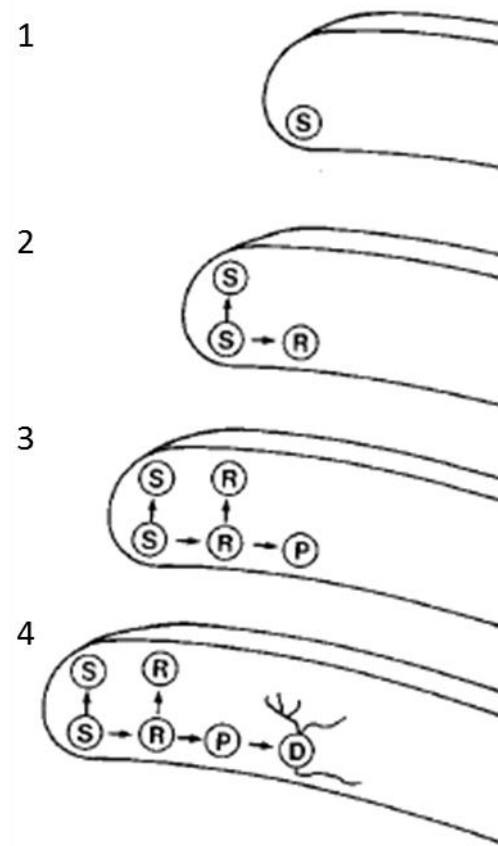


Figure 51: **Modèle de progression de la formation de la rétine à partir d'une cellule souche appartenant à la zone marginale ciliaire.** La cellule souche (S - 1) donne naissance à une autre cellule souche et un rétino­blaste (R - 2), qui donnera à son tour naissance à un autre rétino­blaste et un progéniteur (P - 3) post-mitotique mais indifférencié. Ce progéniteur va donner naissance finalement à un neurone différencié (D - 4). D'après [387].

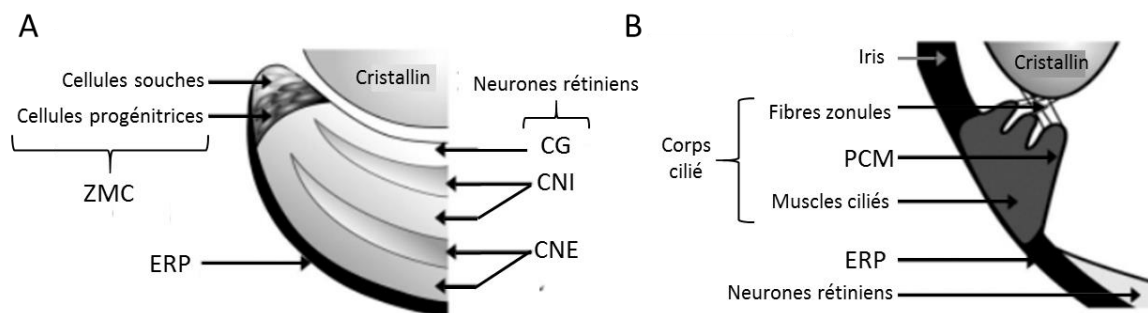


Figure 52: **Localisation des cellules souches rétiniennes** chez le têtard de *Xenopus* (A) et la souris adulte (B). La zone marginale ciliaire (ZMC) chez le xénope et la marge ciliaire pigmentée (MCP ou PCM) du corps cilié chez la souris contiennent des cellules souches, dont les propriétés ont été démontrées uniquement *in vitro* chez la souris. CG : cellules ganglionnaires, CNE : couche nucléaire externe, CNI : couche nucléaire interne, ERP : épithélium rétin­al pigmenté. D'après [377].

Les propriétés des cellules souches de la rétine sont l'objet de nombreuses études chez *Xenopus laevis* d'un point de vue régénératif. En effet, l'œil amphibien est également capable de se régénérer. L'œil de *X.laevis* est également largement utilisé dans un cadre neurophysiologique pour mieux comprendre les mécanismes régulant la formation des réseaux neuronaux au sein de la rétine, les orientations axonales, la synaptogénèse [378]. De plus, des tests de vision peuvent être réalisés afin de tester toute altération fonctionnelle de l'œil. De simples tests de type « comportementaux » reposent sur les faits que *X.laevis* peut modifier la couleur de sa peau en fonction de l'intensité lumineuse de son environnement ou présente une préférence de couleur pour l'environnement et ainsi peut entraîner la modification de la direction de sa nage [390, 391]. Des automates ont d'ailleurs été générés pour améliorer les analyses de ces tests comportementaux [392]. D'autres tests reposent sur des enregistrements électrophysiologiques des cellules neuronales de la rétine pour tester leur fonctionnalité.

Outre les avantages expérimentaux cités précédemment, des stratégies alternatives aux micro-injections ont été mises au point pour cibler les cellules rétiniennes afin d'étudier la rétino-génèse tardive ou la fonctionnalité de l'œil. Il s'agit de la lipofection ou de l'électroporation permettant d'introduire de l'ADN, ARN ou MO dans une zone précise au stade désiré. La première technique utilise un agent lipophile qui est mélangé à la solution nucléotidique lors de la microinjection [393, 394]. La seconde repose sur une injection de ces solutions nucléotidiques chargées dans l'espace entre l'œil et le cerveau suivie d'une application de courant entre deux électrodes placées de part et d'autre de l'embryon [395].

Le modèle *Xenopus laevis* a également permis d'étudier les fonctions des gènes impliqués dans des pathologies oculaires humaines comme celles du gène *PAX6* dont la mutation entraîne le syndrome ANIRIDA [375, 396], ou du gène *RX* (ou *RAX*) dont la mutation cause l'anophtalmie et la sclérocornée [397]. Ces études ont permis de montrer l'implication de ces gènes lors des phases précoces de la formation de l'œil. Ainsi, ce modèle a permis de déterminer le réseau génique impliqué dans la spécification du champ présomptif de l'œil [376, 397] ainsi que l'impact et la régulation des différents facteurs de transcription du champ oculaire (EFTFs pour « eye field transcription factors ») notamment Pax6 [396, 398, 399] et Rx1 [400, 401] sur le développement de la rétine et du cristallin. Ce réseau et les phases du développement de l'œil seront détaillés dans la deuxième partie.

Enfin comme pour le rein, il est possible de former *ex vivo* un œil fonctionnel possédant toute les structures d'un œil normal après induction de calottes animales, comme décrit dans la partie C3 [341]. La greffe de cet œil ectopique est également possible dans un embryon en fin d'organogénèse.

Il est également possible de générer des yeux fonctionnels à partir de calottes animales sur-exprimant le cocktail d'EFTFs [402].



## IV- Projet de thèse

Pour répondre aux questions posées au cours de ma thèse, le modèle d'étude *Xenopus laevis* apparait comme idéal. En effet, ce modèle a permis d'apporter la première évidence *in vivo* du rôle de la signalisation purinergique au cours de l'embryogenèse et de démontrer le rôle des purines extracellulaires au cours du développement de l'œil à travers la régulation du réseau génique EFTF [403].

La première partie de ma thèse m'a permis de caractériser la voie de signalisation de l'adénosine chez le xénope et d'obtenir la première carte d'expression spatio-temporelle comparative de ses différents acteurs au cours de l'embryogenèse d'un vertébré. La seconde partie de ma thèse a consisté en l'étude fonctionnelle de l'ectonucléotidase phosphatase alcaline *alpl* (capable de dégrader l'ATP, ADP et AMP en adénosine). L'étude fonctionnelle de cette enzyme a été déterminée grâce à son profil d'expression particulier, au niveau du pronéphros et de la ZMC de la rétine. Les expériences de perte de fonction d'*alpl* démontrent que cette enzyme est nécessaire à la formation de l'œil et du rein.





# Première partie

---

## Caractérisation des acteurs de la voie de signalisation de l'adénosine

### I- Introduction

Comme nous l'avons montré plus haut, en plus de posséder de nombreux avantages expérimentaux, *Xenopus laevis* est un excellent modèle pour étudier les voies de signalisation au cours du développement embryonnaire [368, 373, 404, 405]. De plus, la plupart des gènes impliqués dans les voies de signalisation importantes est conservée chez les tétrapodes. Ainsi, ce modèle semble très approprié pour étudier la voie de signalisation de l'adénosine. **Que savons-nous sur les acteurs de la voie de signalisation purinergique lors de l'embryogenèse de *Xenopus laevis* [295]?**

#### A. Profil d'expression

##### 1. De l'ATP à l'AMP

Plusieurs données sont disponibles concernant l'expression embryonnaire des acteurs de cette partie de la voie de signalisation purinergique. Quelques profils d'expression obtenus par RT-PCR, hybridation *in situ* ou par Northern-blot, ainsi que quelques analyses phylogéniques, ont été publiés. Il existe également des images d'hybridation *in situ* (HIS) de *Xenopus tropicalis* déposées sur Xenbase par la communauté « xénopiste », sans que celles-ci ne fassent l'objet de publication. Mais, aucune information n'est indiquée sur la sonde utilisée, ni sur les résultats obtenus avec la sonde contrôle (sonde sens). De plus, des EST (Express Sequence Tag) sont également disponibles dans les banques de données et apportent des indications sur l'expression de certains gènes, mais ces informations nécessitent tout de même d'être confirmées.

##### a) *Les enzymes*

Les acteurs les mieux caractérisés sont les enzymes permettant l'hydrolyse ou la génération des molécules d'ATP extracellulaires.

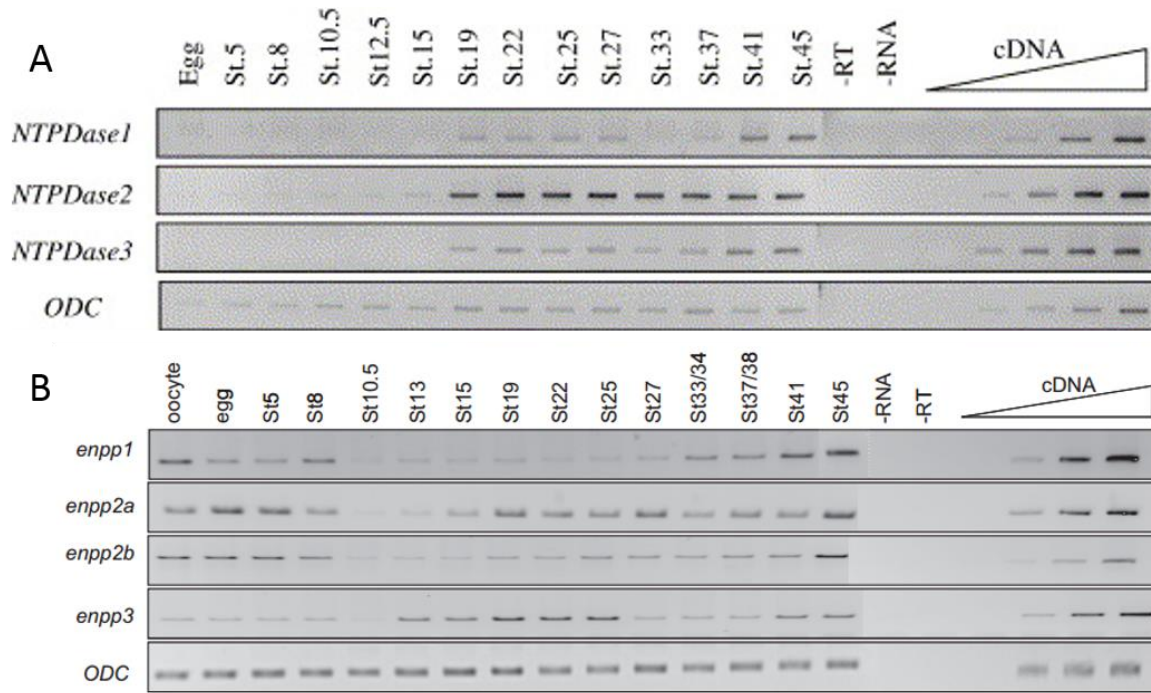


Figure 53 : **Profil d'expression temporel des gènes *entpdase* (A) et *enpp* (B)** impliqués dans la voie de signalisation purinergique au cours de l'embryogenèse de *Xenopus laevis*, obtenu par RT-PCR. ODC est le contrôle de charge. Le triangle représente la linéarité obtenue par double dilution d'ADNc du stade 45, sauf pour *entpdase1* et *enpp2.b* pour lesquels les ADNc des stades 27 et 5 ont été respectivement utilisés. Les colonnes –RT et –RNA sont des contrôles négatifs. St : stade ; (A) Egg : ovocyte non fécondé ; (B) Egg : ovocyte fécondé. D'après [406] (A) et [295] (B).

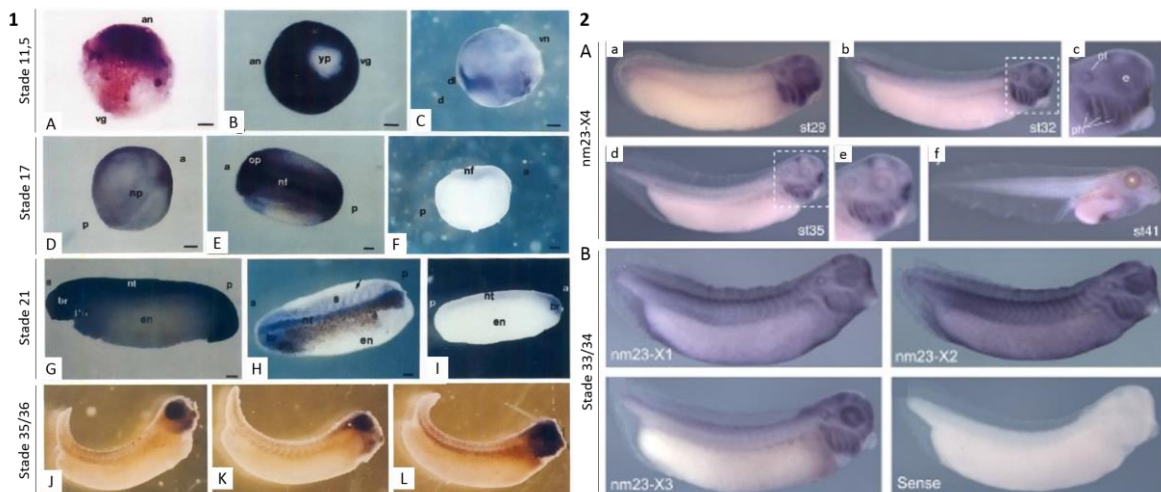


Figure 54: **Expression des membres de la famille *ndpk* dans l'embryon de *Xenopus laevis*.** (1) Profil d'expression des gènes *ndpk1* (images A, D, G et J), *ndpk2* (images B, E, H et K) et *ndpk3* (images C, F, I et L) aux stades indiqués, obtenu par hybridation in situ (D'après Ouatas, 1998). (2) Profil d'expression obtenu par hybridation in situ des gènes *ndpk4* (*nm23-X4*) aux stades indiqués (A) et *ndpk1*, 2 et 3 (*nm23-X1*, -X2 et -X3, respectivement) au stade 33 (B). Les images c et e représentent des zooms au niveau de la tête des embryons de stade 32 et 35, respectivement (A). Le contrôle négatif est indiqué « sense » pour sonde sens (C). D'après [407].

### (1) Les ectonucléotidases, hydrolysant l'ATP

Les membres des familles des *entpdase* et des *enpp* ont été caractérisés chez *X.laevis* [406, 408]. Les études phylogénétiques montrent une forte conservation de ces deux familles au cours de l'évolution : tous les gènes sont retrouvés, excepté *enpp5*. De plus, l'expression de tous les membres a été détectée au cours du développement embryonnaire par RT-PCR, sauf *enptdase8*. Ainsi, sur les sept protéines capables d'hydrolyser l'ATP extracellulaire, six sont exprimées au cours de l'embryogénèse et chacun de ces gènes présente un profil d'expression spécifique et dynamique (**figure 53**). Les gènes *entpdase1*, 2 et 3 ne sont pas maternels et leur expression zygotique est détectée dès le début de la neurulation (stade 12,5) pour *entpdase2*, ou seulement à partir de la fin de neurulation (stade 19) pour *entpdase1* et 3 [406]. Les *enpp1*, 2a, 2b et 3 ont, quant à eux, une expression maternelle. Leur expression zygotique est détectée à partir de la neurulation. A l'exception d'*enpp3*, le niveau de leur expression augmente jusqu'à la fin de l'organogénèse. Les profils d'expression spatiale ont été déterminés par hybridation *in situ*, excepté pour *enpp3*, et chacun de ces gènes présente une expression distincte. Les gènes *entpdase1* et *enpp1* sont exprimés dans le compartiment vasculaire, avec une expression forte dans l'îlot sanguin ventral. L'expression d'*entpdase2* est exclusivement détectée dans les somites. Les gènes *entpdase3* et les homéologues *enpp2* présentent une expression neurale, avec en particulier *enptdase3* exclusivement exprimé au niveau de la moelle épinière dorsale.

### (2) Les enzymes générant l'ATP

La famille des gènes *nucléoside diphosphate kinase* (*nm23* ou *nme*) a également été étudiée chez *X.laevis* et le profil d'expression des gènes *nm23-X1*, -X2, -X3 et -X4 codant pour les protéines ndpka, b, c et d a été obtenu par RT-PCR et hybridation *in situ* [407, 409] (**figure 54**). La première étude a permis de comparer l'expression des gènes *nm23-X1*, -X2 et -X3 dès la gastrulation jusqu'au stade 35/36 en utilisant des sondes localisées essentiellement dans les parties non codantes (UTR) [409]. Ces trois gènes sont principalement exprimés dans la partie antérieure de l'embryon : le cerveau, l'œil, l'oreille et les arcs branchiaux (**figure 54**). Le profil d'expression de *nm23-X4* a été obtenu plus récemment [407]. Son expression zygotique est détectée dès la neurulation dans les bourrelets neuronaux, ainsi que dans le tissu présomptif de l'œil. Au stade 35, son expression est restreinte au niveau de la tête, principalement dans l'œil, l'oreille, le cerveau et les arcs branchiaux. L'étude comparative de l'expression des quatre gènes *nm23* à ce stade montre qu'ils ont un profil d'expression spatial différent, avec toutefois une expression forte au niveau de l'œil et des arcs branchiaux. De plus, les profils d'expression de *nm23-X1* et -X2 sont très similaires. Au stade 41, les quatre gènes sont encore exprimés dans l'œil, mais avec des profils différents, *nm23-X1* et -X2 sont exprimés dans toute la rétine, alors que l'expression de *nm23-X3* et -X4 est restreinte à la zone marginale ciliaire [407]. Les différences de profils obtenus au stade 35 entre les deux études peuvent être expliquées entre autre par les sondes utilisées (sondes principalement localisées dans les UTR versus ADNc entier).

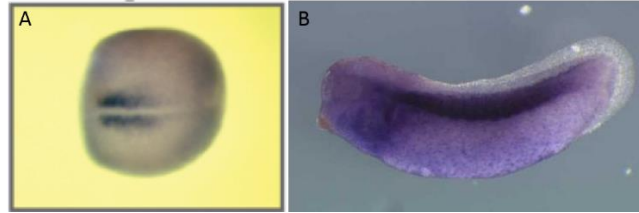


Figure 55 : **Expression de l'adenylate kinase 1 dans l'embryon de xénope** au stade 13 (*Xenopus laevis* - [410] - A) et 28 (*Xenopus tropicalis* – Xenbase - B), obtenue par hybridation *in situ*.

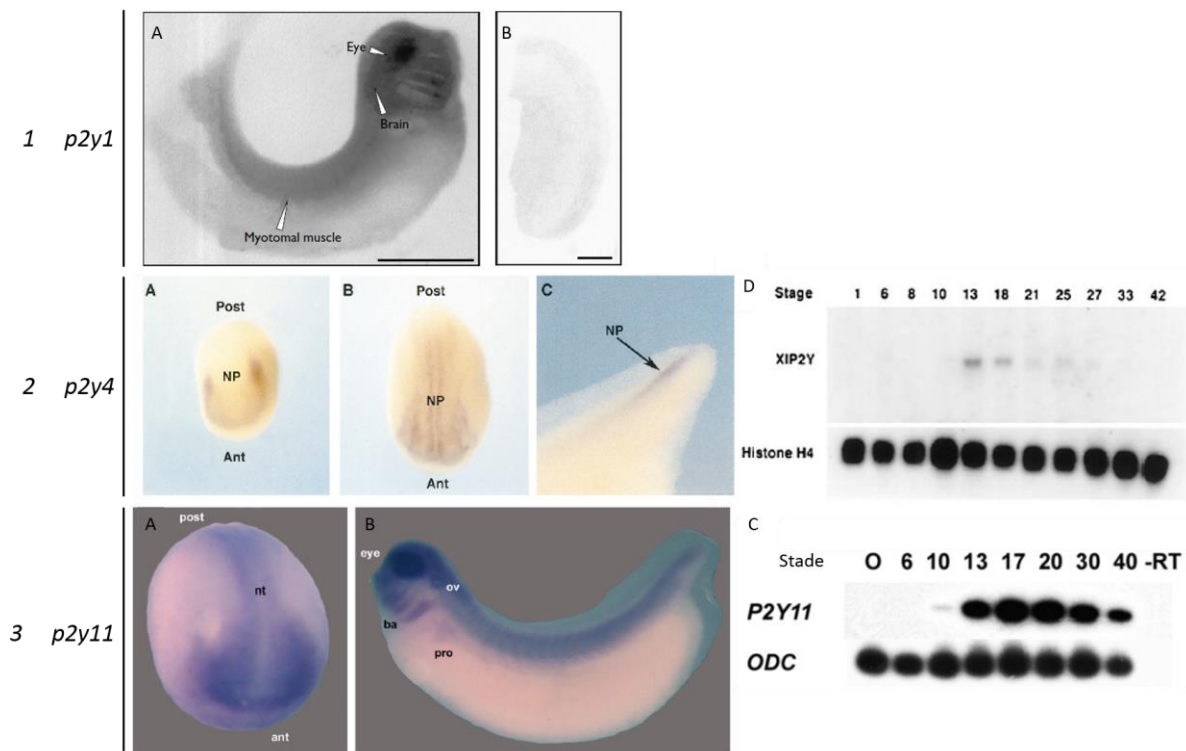


Figure 56 : **Profil d'expression temporelle des récepteurs *p2y1*, *p2y4* et *p2y11* au cours du développement embryonnaire de *Xenopus laevis*.** (1) L'expression de *p2y1* a été analysée par hybridation *in situ* au stade 28 (A). Un embryon de stade 32 hybridé avec une sonde sens est utilisé comme contrôle (B). D'après [411]. (2) Le profil d'expression de *p2y4* a été obtenu par hybridation *in situ* sur des embryons de stade 14 (A), 17 (B) et 28 (C), et par Northern-Blot à différents stades embryonnaires (D). XIP2Y : *p2y4* ou *p2y8*. Histone H4 est le contrôle de charge. D'après [412]. (3) Le profil d'expression de *p2y11* a été obtenu par hybridation *in situ* sur des embryons de stade neurula âgée (A) et stade 28 (B), et par RT-PCR sur différents stades de développement (C). D'après [412]. ODC est le contrôle de charge. -RT est le contrôle négatif. D'après [414]. Ant : antérieur ; ba : arc branchiaux ; Brain : cerveau ; Eye : œil ; NP: plaque neurale ; nt : tube neural ; Post : postérieur ; O : ovocyte ; ov : vésicule otique ; stage : stade.

De plus, une analyse bioinformatique montre que *nm23-X3* (ou *nme3*) possède un homéologue qui code pour une protéine présentant 94,7% d'identité avec *ndpkc*. Aussi, l'interrogation de Xenbase montre que *nm23-X2* n'est pas référencée, alors que *nm23-X1* est identique au gène *nucléoside diphosphate kinase 2* (*nme2*) qui est également présent sous forme d'homéologues. Ceci pose la question de la spécificité des sondes utilisées, puisque les séquences correspondantes aux différents clones *nm23-X1*, *-X2* et *-X3* ne sont plus disponibles sous leur numéro d'accèsion publié [409]. Concernant les quatre autres membres de la famille *ndpk*, des ESTs ont été identifiés pour *nm23-X5*, *X6* et *X8* mais seuls *nm23-X5* et *nm23-X8* semblent être exprimés durant le développement embryonnaire (Xenbase).

Peu de données sont disponibles en ce qui concerne l'*adénylate kinase 1*. Une étude transcriptomique montre que son expression zygotique est induite lors de la neurulation et le niveau d'expression augmente jusqu'au stade 33, dernier stade testé [413]. Deux images d'hybridation *in situ* sont également disponibles sur le site Xenbase (**figure 55**). La première montre que l'expression d'*ak1* est détectée au stade 13 dans deux bandes le long du tube neural au niveau du mésoderme paraxial [410]. La seconde image est issue d'une hybridation *in situ* effectuée sur un embryon de *Xenopus tropicalis* (communauté xénopiste). Au stade 28, *ak1* est exprimé dans les somites, les arcs branchiaux et dans l'épiderme.

#### b) *Les récepteurs p2*

En ce qui concerne les récepteurs p2, très peu de données sont publiées. Seuls les profils d'expression des expressions embryonnaires des récepteurs p2y1, p2y4 (publié sous le nom de p2y8 ou Xlp2y) et p2y11 ont été générés par hybridation *in situ*, RT-PCR et Northern-Blot [411, 412, 414]. Les données disponibles montrent que ces récepteurs sont exprimés lors de la neurulation dans le tissu nerveux (**figure 56**). Lors de l'organogénèse, leur expression se retrouve dans le tissu nerveux, de manière exclusive ou non (**Tableau 5**).

Au laboratoire, l'étude comparative de tous les récepteurs p2 ATP-dépendants chez *X.laevis* a fait l'objet d'un sujet de stage de Master deuxième année (C. Blanchard, 2013-2014). Leurs profils d'expression ont été caractérisés par RT-PCR et par hybridation *in situ*. Chaque récepteur possède un profil d'expression spatiale et temporelle différent (Blanchard et Massé, résultats non publiés).

La carte regroupant les profils d'expression temporelle connus des acteurs initiant la voie de signalisation purinergique au cours de l'embryogenèse de *Xenopus laevis* est représentée dans la **figure 57**.



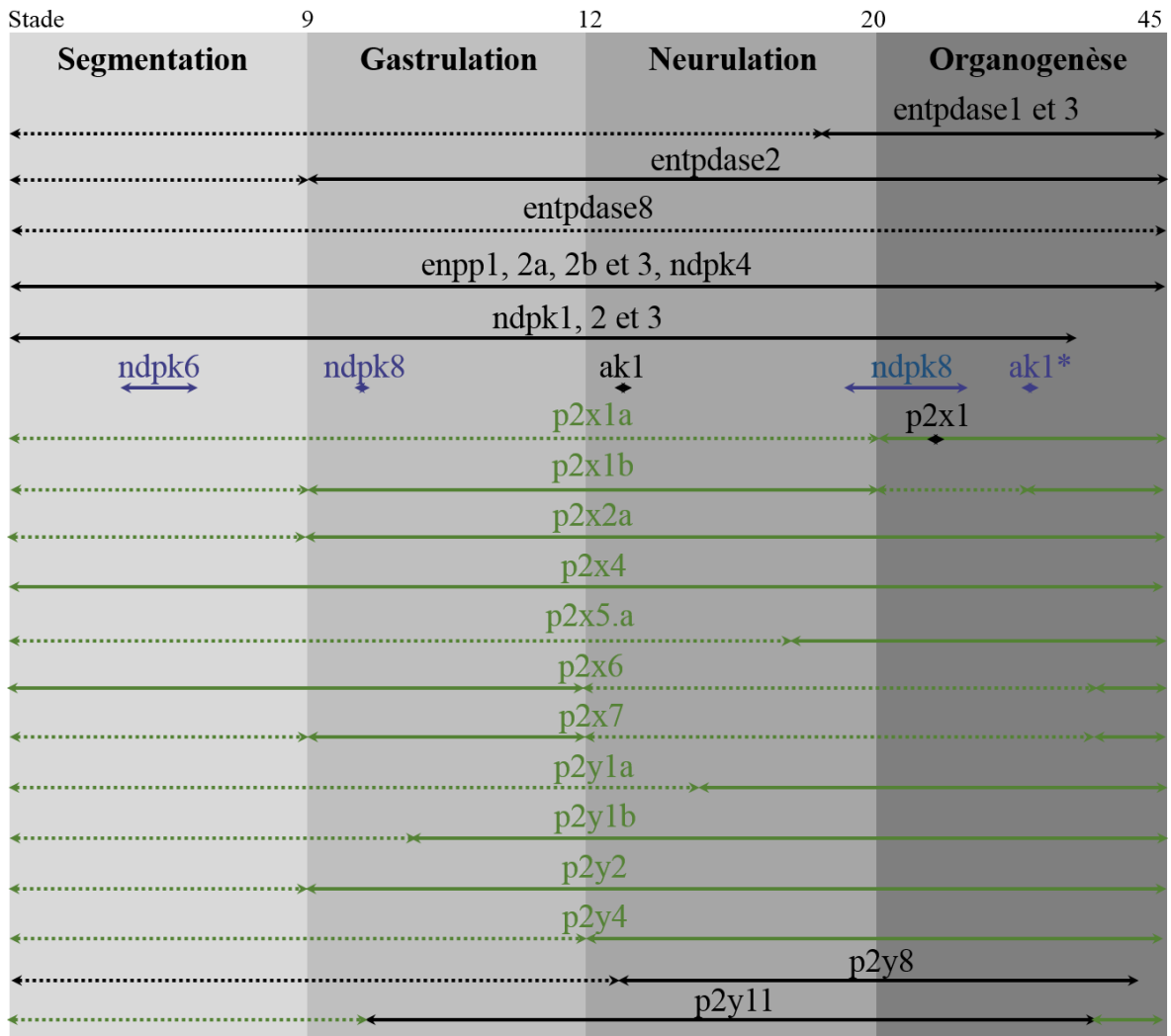


Figure 57 : **Profil d'expression temporel des acteurs du début de la voie de signalisation purinergique décrits chez *Xenopus laevis*.** Les flèches noires représentent l'expression des enzymes et des récepteurs décrits dans la littérature au cours des 4 phases majeures du développement embryonnaire (segmentation, gastrulation, neurulation et organogenèse). Les flèches bleues représentent les expressions des gènes associés, disponibles dans les banques de données et les flèches vertes celles qui feront prochainement l'objet d'une publication (Blanchard et Massé). Les pointillés représentent les stades où les gènes indiqués ne sont pas exprimés. L'expression du gène *ak1* a été déterminée chez *Xenopus tropicalis* (astérisque).



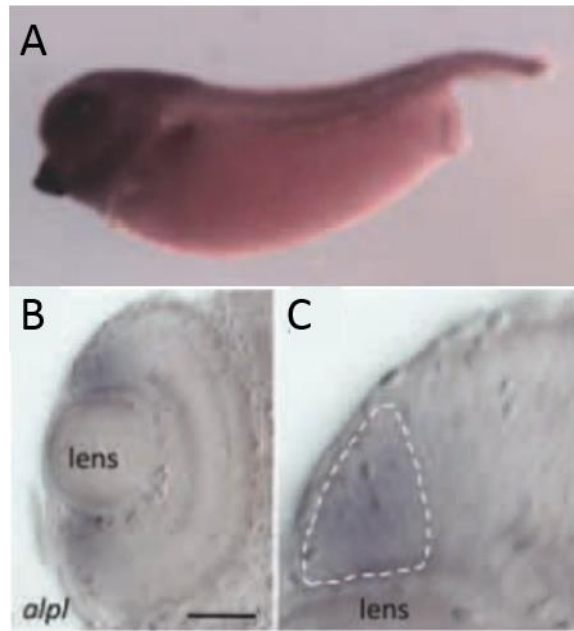


Figure 58: **Expression d'*alpl* dans un embryon de *Xenopus tropicalis* au stade 39**, obtenue par hybridation *in situ*. (A) Embryon entier vue latérale (A), coupe de l'œil (B) et zoom sur la zone marginale ciliaire dorsale (C). Les pointillés délimitent le marquage. Lens : cristallin. D'après [381].

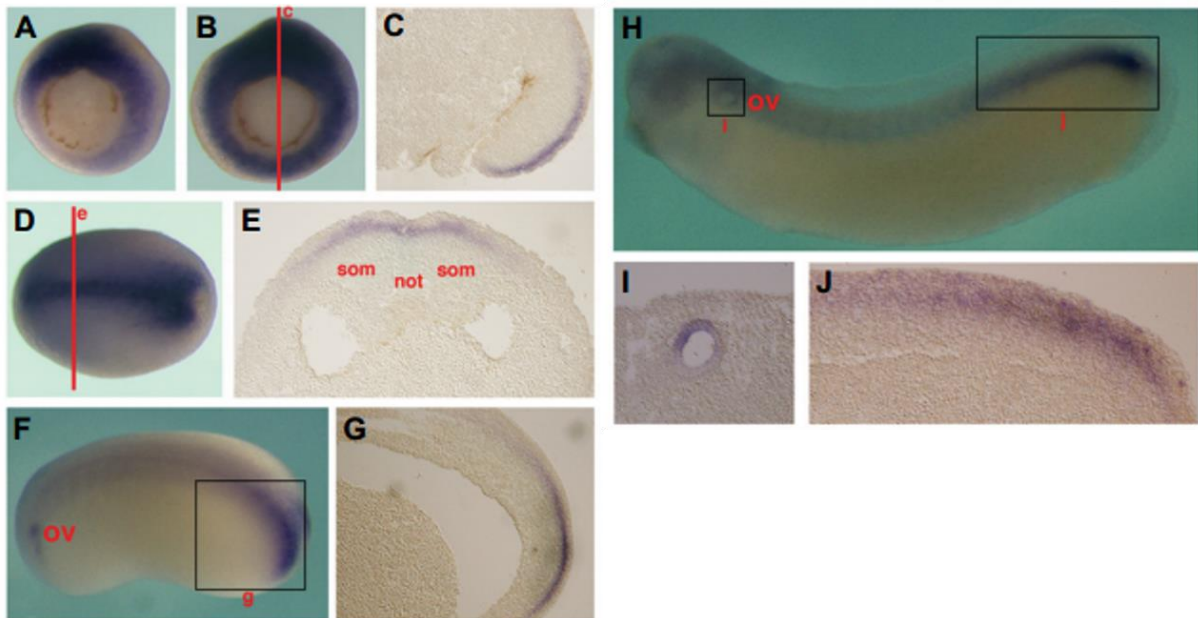


Figure 59: **Profil d'expression spatio-temporel de *pnp* au cours du développement embryonnaire de *Xenopus laevis***, aux stades 10,5 (A), 11 (B et section en C), 15 (D et section en E), 22 (F et section en G) et 28 (H et sections en I et J). som : somites ; not : notochorde ; ov : vesicule otique. D'après [415].

## 2. La voie de signalisation de l'adénosine

Contrairement aux acteurs débutant la voie de signalisation purinergique, très peu de données sont disponibles concernant la caractérisation chez *Xenopus laevis* des autres acteurs de la voie, liés à la signalisation de l'adénosine (enzymes de production et dégradation, récepteurs et transporteurs). Ces données sont parcellaires et obtenues par différentes méthodes.

### a) Les enzymes

#### (1) Les enzymes générant l'adénosine

La seule donnée d'hybridation *in situ* concernant une enzyme générant l'adénosine est pour l'alkaline phosphatase *alpl* publiée chez *X.tropicalis* [381] (**figure 58**). L'expression du gène *alpl* est retrouvée dans la rétine au stade 39, et plus particulièrement dans la zone marginale ciliaire contenant les cellules souches et progénitrices rétinienne. Cependant, plusieurs ESTs (Unigene : Xl.1299) ont été trouvés à divers stades embryonnaires chez *Xenopus laevis* (Xenbase).

Seules quelques séquences ESTs sont disponibles pour *cd73* et *acpt*. Ces ESTs proviennent de banques d'ADNc générées à partir d'embryons en phase de neurulation (stade 15 pour *cd73* et stade 17 à 19 pour *acpt*).

#### (2) Les enzymes dégradant l'adénosine

La seule enzyme de dégradation de l'adénosine dont le profil d'expression ait été publié est la purine nucleoside phosphorylase *pnp*. Ce profil d'expression spatiale a été obtenu par hybridation *in situ* sur des embryons à différents stades embryonnaires [415] (**figure 59**). Son expression est dynamique au cours du développement, mais elle est principalement associée aux tissus neuraux et au mésoderme non segmenté ou indifférencié. Cependant, l'étude est limitée à quelques stades du début de la gastrulation (stade 10,5) au milieu de l'organogenèse (stade 28).

Des ESTs correspondant au gène codant pour l'enzyme adenosine deaminase *ada* ont été identifiés aux stades gastrula (stades 10 à 12,5) et à des stades d'organogénèse (stade 25) et de métamorphose (Xenbase).

### b) Les récepteurs *adora/p1*

Des études électrophysiologiques suggèrent que le récepteur *adora1* serait exprimé au niveau de la moelle épinière à la fin de l'organogenèse (stades 37/38 et 41) [326]. Une séquence EST a aussi été déterminée à la fin de la gastrulation (stade 12,5).

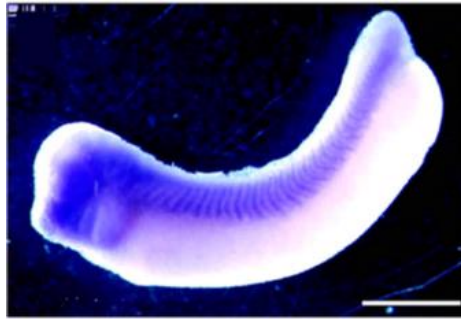


Figure 60: Expression du récepteur *adora2a* dans un embryon de *Xenopus laevis* au stade 30. D'après [310].

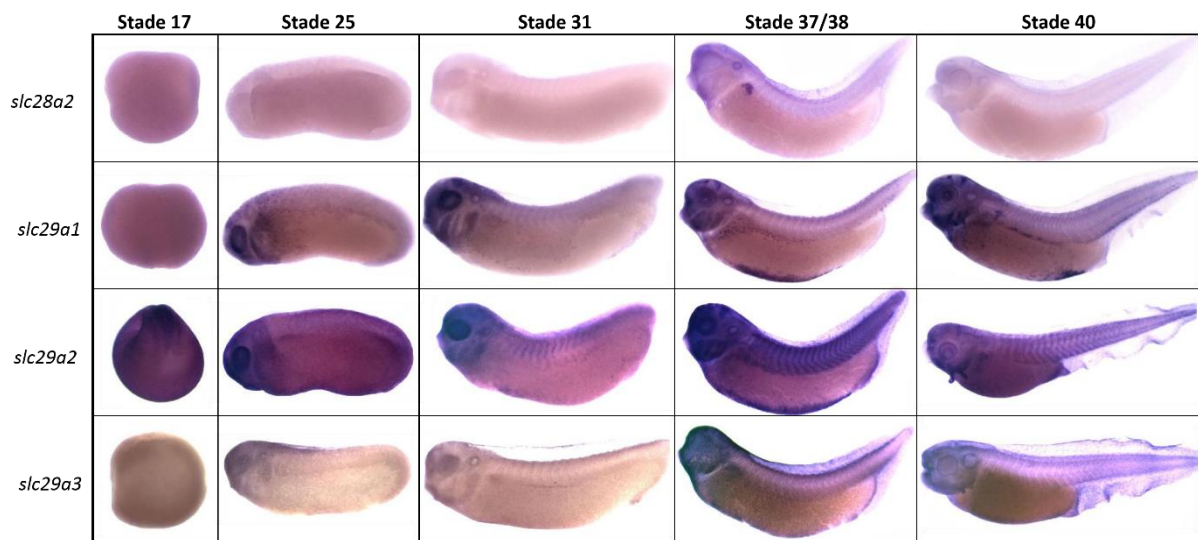


Figure 61: Profil d'expression spatio-temporel des transporteurs *slc28a2* et *slc29a1*, 2 et 3 au cours du développement embryonnaire de *Xenopus tropicalis* aux stades indiqués. (D'après Xenbase)

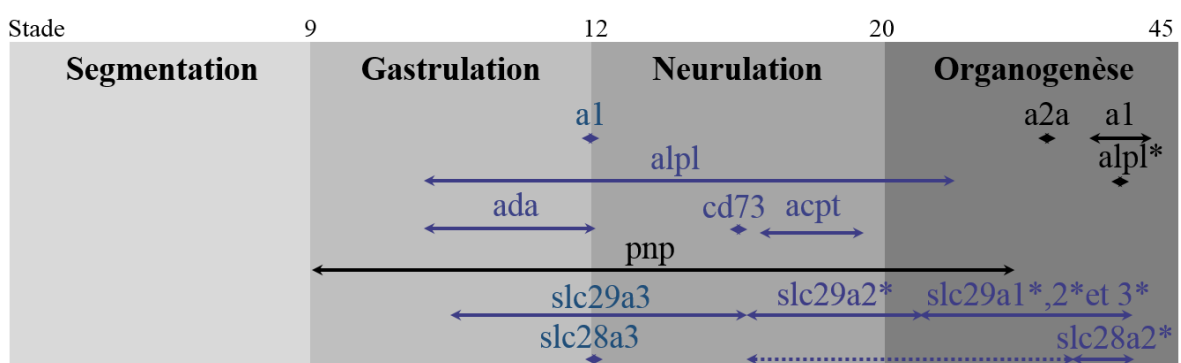


Figure 62: Profil d'expression temporel des acteurs de la voie de signalisation de l'adénosine décrits chez *Xenopus laevis*. Les flèches noires représentent l'expression des enzymes et des récepteurs décrits dans la littérature au cours des 4 phases majeures du développement embryonnaire (segmentation, gastrulation, neurulation et organogenèse). Les flèches bleues représentent les expressions des gènes associés, disponibles dans les banques de données. Les pointillés représentent les stades où les gènes indiqués ne sont pas exprimés. Les gènes dont l'expression embryonnaire a été analysée chez *Xenopus tropicalis* sont suivis d'un astérisque.

La seule donnée concernant le profil d'expression d'*adora2a* est issue de la publication de Lijima *et al* [310]. Cette image d'hybridation *in situ* montre un profil d'expression assez large en phase d'organogénèse (stade 30), notamment un marquage au niveau de l'œil, des somites, des arcs branchiaux, et du cerveau (**figure 60**).

### c) *Les transporteurs de nucléosides*

Quelques images d'hybridation *in situ* déposées par la communauté « xénopiste » recouvrant cinq stades de développement de *Xenopus tropicalis* sont disponibles sur le site Xenbase (**figure 61**). Le profil d'expression de trois des quatre membres de la famille *slc29a* codant les ent a été déterminé : *slc29a2* est le seul exprimé au cours de la neurulation (stade 17). Au cours de l'organogénèse, les gènes *slc29a* présentent des profils d'expression distincts. *Slc29a1* est exprimé au niveau de l'îlot sanguin ventral, ainsi qu'au niveau du rein, de l'œil et du cerveau. L'expression de *slc29a2* est retrouvée dans les somites, l'îlot sanguin ventral, ainsi qu'au niveau de la tête (œil et cerveau). Le profil d'expression de *slc29a3* est moins précis, avec cependant une expression au niveau rénal. Seul le profil du gène *slc28a2* appartenant à la famille des gènes codant pour les cnt a été déterminé. Celui-ci possède une expression zygotique tardive, mais tissu-spécifique au niveau du rein embryonnaire. De plus, des séquences ESTs ont été déterminées pour le gène *slc29a3* en fin de gastrulation, début de neurulation, puis en début d'organogénèse et pour le gène *slc28a3* au début de la neurulation (stade 12,5).

Il est donc possible de dresser la carte d'expression des acteurs de la voie de signalisation de l'adénosine au cours de l'embryogenèse de *Xenopus laevis* (**figure 62**). Cependant, celle-ci est très incomplète.

## B. Etudes fonctionnelles

Les études fonctionnelles des différents acteurs de la voie de signalisation sont très peu nombreuses.

Le rôle embryonnaire de l'enzyme entpdase2 a été étudié chez *Xenopus laevis* par des approches de gain et perte de fonction, montrant son implication dans le développement de l'œil [403]. En effet, la surexpression ciblée de son gène entraîne la formation d'un œil ectopique lors de l'organogénèse, *via* l'augmentation de l'expression du réseau génique impliqué dans la formation de l'œil [416]. De plus, l'inhibition de l'expression de l'*entpdase2*, simultanément à celle du récepteur ADP dépendant *p2y1*, grâce à la technique morpholino, entraîne la perte de l'œil et de l'expression des gènes marqueurs précoces de l'œil. Ces résultats démontrent que l'ADP est la purine extracellulaire impliquée dans ce processus.



Le rôle de l'enzyme ndpk4 codée par *nm23-X4* au cours de l'embryogenèse a également été étudié chez *X.laevis* par des approches fonctionnelles, de surexpression, et de sous-expression par l'utilisation de shRNA [407]. Cette étude montre l'implication de cette enzyme au cours de la gliogénèse de l'œil. En particulier, ndpk4 inhibe l'activité gliogénique de la cdki p27Xic1 en agissant sur la phase finale de la détermination cellulaire rétinienne, à savoir la production des cellules gliales de Müller. De plus, les effets de la surexpression de *nm23-X4* suggèrent également un rôle activateur de la gliogénèse pour cette enzyme mais de façon cdki-indépendante.

L'implication des différents récepteurs purinergiques a été démontrée par des méthodes chimiques. L'administration d'antagonistes des récepteurs p2 dans les phases précoces de l'embryogenèse de *Xenopus laevis* provoque des défauts au niveau de la gastrulation et entraîne la formation d'embryons ventralisés [417]. L'activation des récepteurs p1 par l'administration d'adénosine à la fin de la gastrulation (stade 12) entraîne des défauts dans la formation des somites en milieu d'organogenèse (stade 35/36) et une réduction de l'expression du marqueur somitique *myoD* dès la neurulation (stade 20) [310]. De plus, le blocage de ces récepteurs entraîne des défauts au niveau de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse en milieu d'organogenèse (stade 35/36) [311]. Ces résultats démontrent l'implication de l'adénosine lors du développement des somites et des vaisseaux sanguins, cependant, les mécanismes restent inconnus.

Bien qu'il soit clair que l'adénosine est impliquée dans le développement embryonnaire de certains organes de *Xenopus laevis* [310, 311], le mécanisme de ses effets reste très mal compris. De plus, les acteurs pouvant provoquer ces effets restent très peu caractérisés dans ce modèle. Pour ces différentes raisons, nous avons décidé de déterminer le profil d'expression de chaque acteur de cette voie. Ce travail nous a permis de générer la première carte d'expression comparative des gènes de la voie de signalisation de l'adénosine au cours de l'embryogenèse, en utilisant les mêmes méthodes, dans le même modèle animal vertébré. Cette étude est nécessaire en vue d'analyses fonctionnelles approfondies de ces gènes *in vivo* (deuxième partie).

## **II- Résultats**

Les données expérimentales acquises au cours de la première partie de ma thèse sont présentées ici sous forme d'un article scientifique publié dans le journal *Purinergic Signalling* et de résultats complémentaires.

L'article est centré sur le clonage et la caractérisation des différents acteurs de la voie de signalisation de l'adénosine chez le xénope. Nous y présentons les analyses phylogéniques de chaque acteur du métabolisme de l'adénosine, obtenues après avoir déterminé les séquences des gènes et protéines orthologues des mammifères chez *Xenopus laevis* et *tropicalis*. Cette étude a permis



d'identifier vingt-neuf séquences chez *X.laevis* codant pour sept enzymes de production, six enzymes de dégradation de l'adénosine, des neuf récepteurs adora et sept transporteurs nucléosidiques, ainsi que vingt-deux séquences chez *X.tropicalis* (onze enzymes impliquées dans le métabolisme de l'adénosine, sept adora recepteurs and cinq transporteurs). Puis, nous exposons la première carte d'expression spatio-temporelle de ces acteurs, en comparant leur distribution au cours de l'embryogenèse de *Xenopus laevis*, et chez le crapaud adulte. Chaque gène possède une expression spécifique et dynamique, suggérant que la concentration en adénosine est régulée durant le développement embryonnaire temporellement et spatialement. Cependant, par HPLC, nous montrons que la concentration en adénosine dans l'embryon au cours du développement est très faible et reste constante. Ces résultats vont dans le sens des résultats observés chez la souris et l'oursin: un excès d'adénosine semble néfaste pour un développement embryonnaire normal. Ce travail est le premier décrivant et comparant les profils d'expression complets des acteurs de la voie de signalisation de l'adénosine durant le développement d'un organisme modèle vertébré. Les références de l'article et la numérotation des figures (Fig) sont propre à l'article tel qu'il est publié [418].

Les résultats complémentaires regroupent les études phylogéniques non montrées dans l'article, ainsi que des profils d'expression additionnels, obtenus par hybridation *in situ*. Ces résultats seront inclus dans des publications ultérieures.





**A. Article**

**Comparative genomic and expression analysis of the adenosine signalling pathway members in *Xenopus*.**

Alice Tocco<sup>1,2</sup>, Benoit Pinson<sup>3,4</sup> Pierre Thiébaud<sup>1,2</sup>, Nadine Thézé<sup>1,2</sup>, Karine Massé<sup>1,2, \*</sup>

<sup>1</sup>University of Bordeaux, CIRID UMR 5164, F-33000, Bordeaux, France.

<sup>2</sup>CNRS, CIRID, UMR 5164, F-33000 Bordeaux, France

<sup>3</sup> Université de Bordeaux, IBGC UMR 5095 1, F-33077 Bordeaux, France

<sup>4</sup> CNRS, IBGC UMR 5095 1, F-33077 Bordeaux, France

\* corresponding author

[karine.masse@u-bordeaux.fr](mailto:karine.masse@u-bordeaux.fr)

Phone: +33 (0)557579266

Fax: +33 (0)557571472



# Comparative genomic and expression analysis of the adenosine signaling pathway members in *Xenopus*

Alice Tocco · Benoît Pinson · Pierre Thiébaud ·  
Nadine Thézé · Karine Massé

Received: 14 August 2014 / Accepted: 30 September 2014  
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2014

**Abstract** Adenosine is an endogenous molecule that regulates many physiological processes via the activation of four specific G-protein-coupled ADORA receptors. Extracellular adenosine may originate either from the hydrolysis of released ATP by the ectonucleotidases or from cellular exit via the equilibrative nucleoside transporters (SLC29A). Adenosine extracellular concentration is also regulated by its successive hydrolysis into uric acid by membrane-bound enzymes or by cell influx via the concentrative nucleoside transporters (SLC28A). All of these members constitute the adenosine signaling pathway and regulate adenosine functions. Although the roles of this pathway are quite well understood in adults, little is known regarding its functions during vertebrate embryogenesis. We have used *Xenopus laevis* as a model system to provide a comparative expression map of the different members of this pathway during vertebrate development. We report the characterization of the different enzymes, receptors, and nucleoside transporters in both *X. laevis* and *X. tropicalis*, and we demonstrate by phylogenetic analyses the high level of conservation of these members between

amphibians and mammals. A thorough expression analysis of these members during development and in the adult frog reveals that each member displays distinct specific expression patterns. These data suggest potentially different developmental roles for these proteins and therefore for extracellular adenosine. In addition, we show that adenosine levels during amphibian embryogenesis are very low, confirming that they must be tightly controlled for normal development.

**Keywords** Adenosine metabolism · Adenosine receptor · Embryogenesis · Extracellular adenosine · Nucleotide transporter · *Xenopus*

## Introduction

Extracellular adenosine, an endogenous purine nucleoside, is one of the key mediators of the purinergic signaling pathway [1]. Its inhibitor effect on neurotransmitter release was discovered four decades ago [2]. This molecule plays multiple roles in adult physiology and pathophysiology and regulates various processes through the activation of four specific P1 receptors named ADORA (A) 1, 2A, 2B, and 3 [1, 3–6]. These receptors are members of the rhodopsin-like family of G-protein-coupled receptors. ADORA1 and ADORA3 are negatively coupled to adenylate cyclase and their activation inhibits cAMP production, whereas ADORA2A and ADORA2B are positively coupled to adenylate cyclase and elevates cAMP.

Different actors of the purinergic signaling pathway regulate adenosine concentration in the extracellular space. Ectonucleotidases on the cell surface allow the production of adenosine from the sequential degradation of extracellular ATP in ADP and AMP [7]. Four major families exist and work in concert or consecutively. Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase family (NTPDases) includes nine

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s11302-014-9431-6) contains supplementary material, which is available to authorized users.

A. Tocco · P. Thiébaud · N. Thézé · K. Massé  
Université de Bordeaux, CIRID UMR 5164, F-33000 Bordeaux,  
France

A. Tocco · P. Thiébaud · N. Thézé · K. Massé (✉)  
CNRS, CIRID UMR 5164, F-33000 Bordeaux, France  
e-mail: karine.masse@u-bordeaux.fr

B. Pinson  
Université de Bordeaux, IBGC UMR 5095 1, F-33077 Bordeaux,  
France

B. Pinson  
CNRS, IBGC UMR 5095 1, F-33077 Bordeaux, France

mammalian proteins which can hydrolyze extracellular nucleoside 5'-triphosphate (NTP) and 5'-diphosphate (NDP) in nucleoside monophosphate (NMP) with specific substrate specificity. Seven ecto-nucleotide pyrophosphates/phosphodiesterases (ENPPs) were found in mammals, but only three (ENPP1, 2, and 3) can hydrolyze nucleotides and generate NMP or NDP from NTP, and NMP from NDP. ENPP2 displays a wider catalytic capacity by being able to hydrolyze AMP to adenosine. However, a recent study demonstrated that ENPP4 could generate ADP and ATP from diadenosine polyphosphates [8]. The functional role of each enzyme is very variable and depends on the specific nucleotide or non-nucleotide substrate [9]. Alkaline phosphatases (APs) reveal hydrolysis properties with broad substrate specificity [7]. Several paralogs are expressed in vertebrate and their number varies between species. In human, four APs have been characterized and named according to their predominant distribution in adult tissues. ALPL or TNAP (tissue-non-specific AP) is ubiquitous but highly expressed in the liver, bone and kidney, while ALPP or PLAP (placental AP), ALPP2 or GCAP (germ cell AP) and ALPI or IAP (intestinal AP) show a more restricted tissue distribution. APs can sequentially dephosphorylate extracellular ATP, ADP, and AMP to adenosine and are the only ectonucleotidases with this property. The major function of NT5E (ecto-5'-nucleotidase) or CD73 is the hydrolysis of extracellular AMP in adenosine like other ribonucleotidases and deoxyribonucleotidases [7]. Recently, it was demonstrated an ectonucleotidase function to prostatic acid phosphatases (PAP), producing adenosine from extracellular AMP, a minor extent ADP, but not ATP [10]. Four other isoenzymes have been identified: erythrocytic, macrophagic, lysosomal and testicular acid phosphatases [11], but no ectonucleotidase activity have been demonstrated to date. Degradation enzymes hydrolyze successively adenosine in inosine, hypoxanthine, xanthine and finally uric acid that is excreted by the kidney. Adenosine deaminase (ADA) catalyzes the irreversible deamination of adenosine and 2'-deoxyadenosine to inosine and 2'-deoxyinosine, respectively. The (deoxy)inosine is then metabolized into hypoxanthine by the purine nucleoside phosphorylase (PNP) enzyme [12]. These two enzymes display a similar subcellular localization and are expressed in the cytosol but can also be found on the cell surface. Adenosine kinase (ADK) is a cytosolic enzyme which catalyzes the phosphorylation of adenosine to AMP+ADP, using ATP [13].

With adenosine being a hydrophilic molecule, specific nucleotide transporters facilitate its movement across the cell membranes and are indispensable for its recycling into the cell [14, 15]. Equilibrative nucleoside transporters (SLC29A or ENTs) mediate the transport of adenosine and other nucleosides in both directions, according to the nucleoside gradient concentration. Four SLC29A were distinguished: SLC29A1, 2, and 3 (ENT1, 2, and 3) are selective for purine and

pyrimidine nucleosides and SLC29A4 (ENT4) is specifically selective for adenosine. Concentrative nucleoside transporters (SLC28A or CNTs) mediate nucleoside uni-directional transport, coupled with sodium ion gradient. Three different transporters have been described: SLC28A1 and 3 (CNT1 and CNT3) are selective for pyrimidine nucleosides and for adenosine or purines, respectively, and SLC28A2 (CNT2) is selective for purine nucleosides and uridine.

The roles of extracellular adenosine in adult are quite well known, especially in the modulation of the immune and nervous systems, although other organ physiology, such as the kidney and heart, is also regulated by this purine. Adenosine regulates both innate and adaptive immune system cell functions [5]. Indeed, the accumulation of extracellular adenosine drives a strong inhibition of T cell proliferation and immunodeficiency, as observed in the severe combined immunodeficiency disease (SCID) due to adenosine deaminase deficiency [16]. In the nervous system, adenosine has a pervasive and generally inhibitory effect on neuronal activity and modulates neuronal functions and normal behavior mainly through ADORA1 and ADORA2A receptor activation [17]. Its actions generally antagonize those induced by ATP, as in the sleep/wake cycle. Aberrant adenosine signaling has been implicated in several neuropathological conditions ranging from degenerative neuronal diseases to psychiatric disorders and also in non-neuronal pathologies such as cancer [18–22]. However, neuroprotective action of adenosine has been demonstrated in neuroinflammation, epileptic seizures, ischemia via the activation of the ADORA1 receptor, and also in neurodegenerative diseases via the inhibition of ADORA2A receptor [17, 21–23]. Therefore, adenosine receptors are now therapeutic targets with several ligands being in clinical trials or used already in medicine [20, 21]. Furthermore, recent evidences have placed the purinergic signaling pathway as key regulator of stem cell proliferation and differentiation and may open door to novel cell therapy and tissue repair applications [6].

Recent evidence has implicated adenosine into the proliferation of neural progenitors and their differentiation into neurons or oligodendrocytes [3, 24]. However, despite the generation of knockout mice for the ADORA receptors or the enzymes involved in adenosine metabolism, their functions during embryonic development have been poorly studied. Nevertheless, modification of adenosine signaling can have powerful effects on development. Indeed, *Ada*<sup>−/−</sup> mice die prenatally with profound disturbances in purine metabolism affecting not only the developing immune system but also the renal, neural, skeletal, and pulmonary systems [16]. Moreover, constitutive overexpression of *Adora1* in mice caused the development of cardiac dilatation and death within 6 to 12 weeks [25]. Muscle-tissue-specific overexpression of *Adora3* in mice is lethal before E8.5 [26]. Furthermore, an excess of exogenous adenosine blocks mouse and starfish

development [27, 28]. These data suggest that the adenosine levels must be tightly regulated during embryogenesis. Nevertheless, no comprehensive expression profile for the adenosine signaling members during vertebrate embryogenesis is available, and the implication of adenosine during embryogenesis remains still largely unknown.

*Xenopus laevis* provides a powerful model organism for the establishment of the roles of a signaling pathway during vertebrate embryogenesis. *X. laevis* embryo has many advantages, namely the large size, its abundance, and rapid external development. Moreover, this model was used for the first demonstration of the roles of the purinergic signaling pathway during embryogenesis [29]. We have conducted here a comprehensive study of the embryonic expression profile for each actor of the adenosine pathway in the amphibian *X. laevis*, thus realizing the obligatory step before any in vivo functional analysis. Although we have previously described the embryonic expression profiles of *Xenopus* entpdase [30] and enpp [31] gene families, the expression of the other purinergic actors remained poorly documented [32–34].

Here, we report the cloning and characterization of thirteen enzymes involved in the metabolism of adenosine, together with nine adora receptors and seven nucleoside transporters in *X. laevis*. We also present and compare their temporal and spatial expression patterns in frog embryos and their distribution in adult tissues. The identification of these actors in *Xenopus tropicalis* allowed us to provide an in-depth phylogenetic analysis. Furthermore, adenosine concentration was measured during *X. laevis* embryogenesis. This work is the first study that describes and compares the complete embryonic expression pattern of the actors of the adenosine pathway during the development of a vertebrate model organism.

## Materials and methods

### Ethic statement

This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the European Community. The protocol was approved by the “Comité d’éthique en experimentation de Bordeaux” Nu33011005-A.

### Bioinformatics

Sequences were identified on the NCBI and Xenbase databases [35]. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) searches were performed on the NCBI Nucleotide and on the Xenbase *X. laevis* 7.1 Scaffolds genome databases [36]. Conceptual translation of complementary DNA (cDNA) was performed on the ExPASy internet site using the program

Translate Tool ([web.expasy.org/translate/](http://web.expasy.org/translate/)). Accession numbers of all sequences used in this study are given in Supplementary Table S1 and in figure legends.

Alignments were performed using the program CLUSTAL W2 [37]. A phylogenetic tree was created on the Phylogeny.fr platform, using the tree builder program “PhyML” using maximum likelihood [38] and the *Drosophila melanogaster* sequences as root sequences. Synteny maps were generated by comparison of *X. tropicalis*, *Danio rerio*, *Gallus gallus*, *Mus musculus*, and *Homo sapiens* genomics context using the NCBI Entrez Gene of each gene.

### Embryos culture and dissection

Embryos were obtained by in vitro fertilization of eggs collected in 1× Marc’s Modified Ringer’s (MMR) saline solution, from a hormonally stimulated *X. laevis* female by adding crushed testis isolated from a killed male. Fertilized eggs were dejellied in 3 % L-cysteine hydrochloride, pH 7.8 (Sigma-Aldrich), and washed several times with 0.1× MMR. Embryos were then cultured to the required stage in 0.1× MMR in presence of 10 µg/mL of gentamycin sulfate. The embryos were staged according to Nieuwkoop and Faber [39]. Dissections of anesthetized embryos were performed in 0.1× MMR using forceps and an eyebrow hair knife.

### RT-PCR

RNA extraction from whole or dissected embryos and adult tissues, and cDNA synthesis were performed as described by Massé et al. [31]. For each gene, specific primers were designed on two different exons, in order to discriminate genomic from cDNA amplification (Supplementary Table S2). After optimization of the PCR conditions using a gradient PCR machine (Biorad), RT-PCR products were verified by sequencing (Beckman Coulter Genomics Company). For each experiment, the quantity of input cDNA was determined by equalization of the samples with a constant gene, either *odc* (ornithine decarboxylase) or *eflα* (elongation factor 1α). Linearity of the signal was controlled by carrying out PCR reactions on doubling dilutions of cDNA, illustrated by the triangle in Figs. 4, 5, and 6. Negative controls (–RNA, –RT, and –cDNA) were also performed.

### HPLC

Cellular extracts from embryos were prepared by an ethanol extraction method adapted from Loret et al.[40]. In brief, whole embryos were dropped into 5 ml ethanol/10 mM Hepes, pH 7.2 (4:1 v/v), and incubated at 80 °C for 3 min. Samples were evaporated using a rotavapor apparatus. The residue was resuspended in 500 µL of water and insoluble particles were eliminated by centrifugation and the

supernatant was ultra-filtrated on a Nanosep10K® cartridge (Pall). Metabolites were separated on a carbopacPA1 column, linked to an ICS3000 chromatography workstation (Dionex) using a sodium acetate gradient (from 50 to 800 mM) in 50 mM NaOH as described [41]. ATP, ADP, AMP, adenosine, inosine, and hypoxanthine peaks were identified by their retention time as well as by co-injection with standards and/or their UV spectrum signature.

## Results

### Isolation and sequence characterization of adenosine pathway genes and proteins

Table 1 summarizes the official symbol provided by HGNC together with their synonyms of the different actors, enzymes, receptors, and transporters involved in adenosine signaling pathway. We were able to identify the amphibian orthologs for all the members of this pathway except for the SLC281 and SLC29A4 transporters and the ALPP and ALPPL2 phosphatases (Table 1). The amphibian members involved in adenosine signaling pathways were cloned using different strategies (Supplementary Table S3). The amphibian enpp2A, enpp2B, and pnp sequences have been already published [31, 32]. The majority of the *X. laevis* and *X. tropicalis* sequences were available on the Xenbase or NCBI websites (accession numbers given in Supplementary Table S1). However, the remaining sequences were identified by BLASTN on the *X. laevis* genome version 7.1 databases using the *X. tropicalis* orthologous sequences as query sequences. Moreover, two *X. laevis* *ada* (*ada.a* and *ada.2*) and three *adora3* (*adora.1–3*) genes respectively located on the scaffold 14557 and 137317 were identified. These genes are also present in *X. tropicalis* genome and certainly have arisen from genome duplication. They were numbered according to their positions within their scaffolds. Furthermore, this genomic sequence search allowed us to identify a second gene encoding similar *adora1*, *adora2*, *ada.1*, *pnp*, *slc29a1* and *slc29a3* proteins, respectively. These duplicated genes are located on separate scaffolds and must be homeologs, arisen from the *X. laevis* genome polyploidization event [42]. According to the nomenclature gene guidelines, we tagged these homeologs with .a and .b, with the suffix .a being allocated to the published or identified on Xenbase. The different protein sequences were deduced from conceptual translation of the nucleotide sequences.

Each *X. laevis* and *X. tropicalis* sequence was further verified as true ortholog of mammalian genes by sequence alignments, synteny and phylogenetic analyses. We chose to only represent in the following section these analyses for the multigenic families.

### Synteny and phylogenetic analysis of adenosine pathway actors

#### Adenosine production

As we have previously described the phylogenetic analyses of the entpdases and enpp enzyme families [30, 31], we conducted a synteny and phylogenetic analysis for the alkaline and acid phosphatase multigenic families and used the *Drosophila melanogaster* enzymes as root for the phylogenetic tree (Figs. 1, S1, S2 and Table 2 and Supplementary Table S4). Since *X. laevis* genome assembly is not finished, synteny analyses were conducted with the *X. tropicalis* genome. As shown in Fig. 1, there is a clear separation between the tissue-non-specific (ALPL) and the tissue specific (ALPI, ALPP, and ALPPL2) alkaline phosphatases. In contrast to the ALPL proteins, the other alkaline phosphatases seem to be less conserved during evolution. Two *ALPI* genes have been identified in frog, chick, and zebrafish (*ALPI.1* and *ALPI.2*). Although five *ALPI.2* transcripts have been reported in chick, we decided to use only the isoform 5 for our phylogenetic analysis because of its higher level of identity with the human protein. There is a clear separation between the three mammalian enzymes and the non-mammalian ones, which can be correlated with the restricted mammalian expression of the mouse ALPPL2 and human ALPPL and ALPPL2 enzymes. However, the human and mouse *ALPI* genes are more related to their paralog genes than to their orthologs genes. Regarding the non-mammalian enzymes, the *ALPI.1* proteins are more related to their mammalian orthologs. For example, *X. laevis* and *X. tropicalis* *alpi.1* share more than 60 % of identity with the human protein, respectively, whereas the percentage of identity between *Xenopus* and human *ALPI.2* sequence is less than 55 % (Table 2). Synteny analysis confirmed that *Xenopus* identified intestinal alkaline phosphatase genes are the true orthologs of the human, mouse, and chick *ALPI* genes (Supplementary Fig. S1). However, the orientation of these genes is different in mouse. Interestingly, the other alkaline phosphatase genes, human *ALPPL2* and *ALPP* and mouse *Alppl2*, are located on the same chromosomes than the *ALPI* genes.

The phylogenetic analysis of the acid phosphatases demonstrates the separation between the prostatic (ACPP), testicular (ACPT), and lysosomal (ACP2) acid phosphatase groups (Supplementary Fig. S2). Each of these proteins is more related to its orthologs than to the other acid phosphatases in the same species. Our phylogenetic study revealed that the *Xenopus acpt* genes, identified under the *acpp* gene symbol on Xenbase and NCBI websites, are indeed encoding the amphibian orthologs of human ACPT enzyme. Sequence analysis demonstrates that the ACP2 protein is the most conserved enzyme during vertebrate evolution. *Xenopus* and human proteins share more than 55 % of identity, whereas the



**Table 1** Adenosine signaling pathway members studied. The table summarizes the official symbols provided by HGNC (HUGO Gene Nomenclature Committee) of the genes as used on the NCBI website and by the Gene Nomenclature Guidelines from Xenbase website

	<i>X. laevis</i>		<i>X. tropicalis</i>		<i>H. sapiens</i>		<i>M. musculus</i>		<i>G. gallus</i>		<i>D. rerio</i>	
	Gene	Protein	Gene	Protein	Gene	Protein	Gene	Protein	Gene	Protein	Gene	Protein
Production	<i>enpp2a</i>	enpp2a	<i>enpp2</i>	enpp2	<i>ENPP2</i>	ENPP2	<i>Enpp2</i>	Enpp2	<i>ENPP2</i>	ENPP2	<i>enpp2</i>	enpp2
	<i>enpp2b</i>	enpp2b										
	<i>nt5e</i>	nt5e (cd73)	<i>nt5e</i>	nt5e (cd73)	<i>NT5E</i>	NT5E.1 and .2 (CD73.1 and .2)	<i>Nt5e</i>	Nt5e (Cd73)	<i>NT5E</i>	NT5E (3 iso) (CD73)	<i>nt5e</i>	nt5e (cd73)
	<i>alpl</i>	alpl (tnap)	<i>alpl</i>	alpl (tnap)	<i>ALPL</i>	ALPL.1, .2 and .3 (TNAP.1, .2 and .3)	<i>Alpl</i> ( <i>Akp2</i> )	Alpl (Tnap)	<i>ALPL</i>	ALPL (TNAP)	<i>alpl</i>	alpl (tnap)
	<i>alpi.1</i>	alpi.1 (iap.1)	<i>alpi.1</i>	alpi.1 (iap.1)	<i>ALPI</i>	ALPI (IAP)	<i>Alpi</i> ( <i>Akp6</i> )	Alpi (Iap)	<i>ALPP</i>	ALPP (IAP.1)	<i>alpi.1</i>	alpi.1 (iap.1)
	<i>alpi.2</i>	alpi.2 (iap.2)	<i>alpi.2</i>	alpi.2 (iap.2)			<i>Akp3</i>	Iap	<i>ALPI</i>	ALPI (5 iso) (IAP.2)	<i>alpi.2</i>	alpi.2 (iap.2)
					<i>ALPP</i>	ALPP (PLAP)	<i>Alpl2</i> ( <i>Akp5</i> )	Alpl2 (Eap)				
	<i>acpt</i>	acpt (tacp)	<i>acpt</i>	acpt (tacp)	<i>ACPT</i>	ACPT (TACP)	<i>Acpt</i>	Acpt (Tacp)				
Receptors	<i>acp2</i>	acp2 (IACP)	<i>acp2</i>	acp2 (IACP)	<i>ACP2</i>	ACP2.1 and .2 (LACP.1 and .2)	<i>Acp2</i>	Acp2 (LACP)	<i>ACP2</i>	ACP2 (LACP)	<i>acp2</i>	acp2 (IACP)
	<i>acpp</i>	acpp (PACP)	<i>acpp</i>	acpp (PACP)	<i>ACPP</i>	ACPP.1 and .2 (PACP.1 and .2)	<i>Acpp</i>	Acpp.1 and .2 (PACP.1 and .2)	<i>ACPP</i>	ACPP.1 and .2 (PACP.1 and .2)		
	<i>adora1.a</i>	a1.a	<i>adora1</i>	a1	<i>ADORA1</i>	A1	<i>Adora1</i>	A1	<i>ADORA1</i>	A1	<i>adora1</i>	a1
	<i>adora1.b</i>	a1.b										
	<i>adora2a.a</i>	a2a.a	<i>adora2a</i>	a2a	<i>ADORA2A</i>	A2a	<i>Adora2a</i>	A2a	<i>ADORA2A</i>	A2a	<i>adora2a.a</i>	a2a.a
	<i>adora2a.b</i>	a2a.b									<i>adora2a.b</i>	a2a.b
	<i>adora2b.a</i>	a2b.a	<i>adora2b</i>	a2b	<i>ADORA2B</i>	A2b	<i>Adora2b</i>	A2b	<i>ADORA2B</i>	A2b	<i>adora2b</i>	a2b
	<i>adora2b.b</i>	a2b.b										
Degradation	<i>adora3.1</i>	a3.1	<i>adora3.1</i>	a3.1	<i>ADORA3</i>	A3	<i>Adora3</i>	A3	<i>ADORA3</i>	A3	<i>adora3</i>	a3
	<i>adora3.2</i>	a3.2	<i>adora3.2</i>	a3.2								
	<i>adora3.3</i>	a3.3	<i>adora3.3</i>	a3.3								
	<i>adk</i>	adk	<i>adk</i>	adk	<i>ADK</i>	ADK a, .b, .c and .d	<i>Adk</i>	Adk.1 and .2	<i>ADK</i>	ADK	<i>adk</i>	adk.1 and .2
	<i>ada.1a</i>	ada.1a	<i>ada.1</i>	ada.1	<i>ADA</i>	ADA	<i>Ada</i>	Ada	<i>ADA</i>	ADA	<i>ada</i>	ada
	<i>ada.1b</i>	ada.1b										
	<i>ada.2</i>	ada.2	<i>ada.2</i>	ada.2								
	<i>pnp.a</i>	pnp.a	<i>pnp</i>	pnp	<i>PNP</i>	PNP	<i>Pnp.1</i>	Pnp.1	<i>PNP</i>	PNP	<i>pnp</i>	pnp
Transporters	<i>pnp.b</i>	pnp.b					<i>Pnp.2</i>	Pnp.2				
	<i>slc29a1.a</i>	slc29a1.a (ent1.a)	<i>slc29a1</i>	slc29a1 (ent1)	<i>SLC29A1</i>	SLC29A1 (ENT1)	<i>Slc29a1</i>	Slc29a1.1 and .2 (Ent1.1 and .2)	<i>SLC29A1</i>	SLC29A1 (ENT1)	<i>slc29a1</i>	slc29a1 (ent1)
	<i>slc29a1.b</i>	slc29a1.b (ent1.b)										
	<i>slc29a2</i>	slc29a2 (ent2)	<i>slc29a2</i>	slc29a2 (ent2)	<i>SLC29A2</i>	SLC29A2 (ENT2)	<i>Slc29a2</i>	Slc29a2 (Ent2)			<i>slc29a2</i>	slc29a2 (ent2)
	<i>slc29a3.a</i>	slc29a3.a (ent3.a)	<i>slc29a3</i>	slc29a3 (ent3)	<i>SLC29A3</i>	SLC29A3 .a and .b (ENT3.a and .b)	<i>Slc29a3</i>	Slc29a3 (Ent3)	<i>SLC29A3</i>	SLC29A3 (ENT3)	<i>slc29a3</i>	slc29a3 (ent3)
	<i>slc29a3.b</i>	slc29a3.b (ent3.b)										
					<i>SLC29A4</i>	SLC29A4 (ENT4)	<i>Slc29a4</i>	Slc29a4 (Ent4)	<i>SLC28A4</i>	SLC29A4 (ENT4)	<i>slc29a4</i>	slc29a4 (ent4)
					<i>SLC28A1</i>	SLC28A1 (CNT1)	<i>Slc28a1</i>	Slc28a1 (Cnt1)				
	<i>slc28a2</i>	slc28a2 (cnt2)	<i>slc28a2</i>	slc28a2 (cnt2)	<i>SLC28A2</i>	SLC28A2 (CNT2)	<i>Slc28a2</i>	Slc28a2 (Cnt2)	<i>SLC28A2</i>	SLC28A2 (CNT2)		
	<i>slc28a3</i>	slc28a3 (cnt3)	<i>slc28a3</i>	slc28a3 (cnt3)	<i>SLC28A3</i>	SLC28A3 (CNT3)	<i>Slc28a3</i>	Slc28a3 (Cnt3)	<i>SLC28A3</i>	SLC28A3 (CNT3)		

Synonyms are also indicated in brackets. *D.rerio* = *Danio rerio*, *G.gallus* = *Gallus gallus*, *H.sapiens* = *Homo sapiens*, *M.musculus* = *Mus musculus*, *X.laevis* = *Xenopus laevis*, *X.tropicalis* = *Xenopus tropicalis*

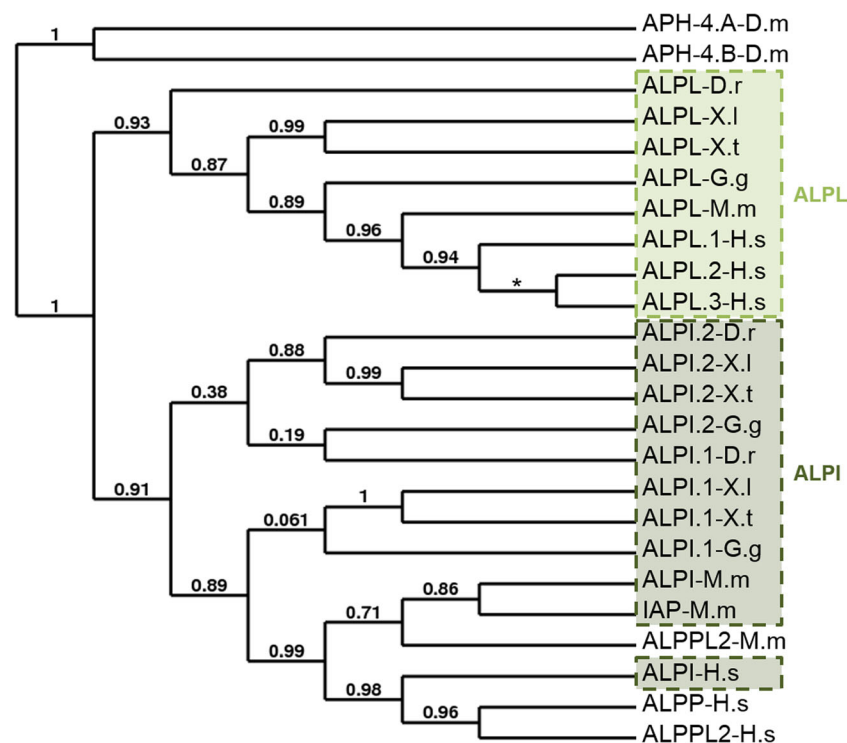
*Xenopus* and human ACPT or ACPP share less than 50 % of identity (Supplementary Table S4).

#### Adenosine receptors

We have identified nine putative ADORA receptors in *X. laevis* and six in *X. tropicalis*. As expected, *adora1*, *adora2a* and *adora2b* homeologs are highly similar, with 94 to 97 % of identity between them (Table 3). The duplicated *adora3*

receptors are less conserved, sharing only 51.1 to 85.4 % of identity. The phylogenetic analysis of these *adora* receptors in *Xenopus* and other vertebrates and invertebrates was carried out using the full sequence of each protein. This analysis demonstrates the clear separation between *adora1-adora3* and *adora2a-adora2b* receptors (Fig. 2a). Each member is more related to its orthologous than to the other family members in the same species. Analysis of the amino acid conservation between *Xenopus* proteins and their mammalian





**Fig. 1** Relatedness of alkaline phosphatase (AP) proteins. A phylogenetic tree of vertebrate AP proteins was constructed on the Phylogeny.fr platform. A cluster algorithm was used to build the tree. Likelihood ratio is indicated at each node of the tree. The *star* represents a trifurcation (likelihood ratio null). The GenBank accession numbers of AP proteins are given in Supplementary Table S1 and as follows: APH-4.A: NP\_524601; APH-4.B: NP\_733413; ALPL-D.r: NP\_957301; ALPL-G.g: NP\_990691; ALPL-M.m: NP\_031457; ALPL.1-H.s: NP\_000469; ALPL.2-H.s: NP\_001120973; ALPL.3-H.s: NP\_001170991; ALPI.1-D.r: NP\_001014375; ALPI.2-D.r: NP\_001020359; ALPI.1-G.g:

XP\_003641809; ALPI.2-G.g: XP\_422743 (isoform 5); ALPI-M.m: NP\_001074551; IAP-M.m: NP\_031458.2; ALPI-H.s: NP\_001622; ALPPL2-M.m: NP\_031459; ALPP-H.s: NP\_001623; and ALPPL2-H.s: NP\_112603. ALPPL2-M.m, embryonic alkaline phosphatase; ALPPL2-H.s, germ cell alkaline phosphatase; ALPI and IAP-M.m, intestinal alkaline phosphatase; ALPI-M.m, intestinal alkaline phosphatase global; ALPP, placental alkaline phosphatase; ALPL, tissue-non-specific alkaline phosphatase. D.m, *Drosophila melanogaster*; D.r, *Danio rerio*; G.g, *Gallus gallus*; H.s, *Homo sapiens*; M.m, *Mus musculus*; X.l, *Xenopus laevis*; X.t, *Xenopus tropicalis*

orthologs showed a higher level of identity among species for a specific ADORA receptor (Table 3). For example, *X. laevis*

adora1.a shares 96.3 and 68.4 % of identity with *X. tropicalis* and human ADORA1 protein, and only 44.9 to 51.8 % of

**Table 2** Identity conservation between the *Xenopus* tissue specific alkaline phosphatase proteins and their human orthologs

		X.l		X.t		M.m			H.s		
		ALPI.1	ALPI.2	ALPI.1	ALPI.2	IAP	ALPI	ALPPL2	ALPI	ALPP	ALPPL2
X.l	ALPI.1	100									
	ALPI.2	56.8	100								
X.t	ALPI.1	88.1	58.6	100							
	ALPI.2	57.6	89.0	59.4	100						
M.m	IAP	60.4	56.8	61.4	55.5	100					
	ALPI	62.6	56.7	61.1	57.3	78.7	100				
	ALPPL2	58.4	55.5	58.0	55.0	74.1	76.4	100			
H.s	ALPI	63.3	53.8	61.9	54.9	77.5	78.2	76.1	100		
	ALPP	59.3	51.5	58.2	49.4	72.9	73.8	74.7	85.5	100	
	ALPPL2	58.1	51.0	57.1	47.6	74.3	75.0	74.5	86.9	96.8	100

The percentage of amino acid identity between proteins was determined by pairwise alignment using Clustal W2 software on the EMBL-EBI Internet site. The accession numbers of the different adenosine member clones are given in Supplementary Table S1 and in the legend of Fig. 1

*H.s* *Homo sapiens*, *M.m* *Mus Musculus*, *X.l* *Xenopus laevis*, *X.t* *Xenopus tropicalis*

**Table 3** Identity conservation between the *Xenopus* ADORA (A) proteins and their human orthologs

			A1				A2a				A2b				A3							
			.a	.b	X.t	H.s	.a	.b	X.t	H.s	.a	.b	X.t	H.s	.1		.2		.3		H.s	
															X.l	X.t	X.l	X.t	X.l	X.t		
A1	.a	X.l	100																			
	.b		96.6	100																		
	X.t		96.3	97.2	100																	
	H.s		68.4	69.2	69.0	100																
A2a	.a	X.l	45.1	45.2	45.7	47.9	100															
	.b		45.4	45.5	46.0	48.5	94.3	100														
	X.t		45.7	46.5	47.9	47.9	94.4	92.8	100													
	H.s		44.2	44.6	45.1	48.2	60.2	61.2	60.2	100												
A2b	.a	X.l	46.9	47.4	46.9	49.4	60.7	58.3	59.5	58.6	100											
	.b		46.6	46.8	46.6	48.8	61.1	58.5	59.5	57.6	97.0	100										
	X.t		46.0	46.5	46.0	48.8	60.8	57.9	59.4	57.6	94.9	94.7	100									
	H.s		42.6	42.8	42.9	44.6	55.7	56.0	56.6	57.8	63.0	62.1	61.1	100								
A3	.1	X.l	44.9	44.9	45.2	46.5	35.4	36.3	36.9	38.1	38.2	38.2	38.2	35.7	100							
		X.t	44.6	44.9	45.5	48.0	37.9	38.2	38.8	39.4	41.2	41.5	41.5	37.9	86.5	100						
	.2	X.l	46.6	47.1	46.0	44.3	37.1	37.1	37.4	39.2	38.3	38.0	38.0	34.9	51.1	51.7	100					
		X.t	49.2	49.2	48.9	46.3	40.8	41.5	40.8	44.4	43.1	43.1	42.4	38.9	52.1	52.4	81.7	100				
	.3	X.l	51.8	51.7	51.2	47.9	41.1	41.5	41.8	42.4	42.7	42.1	41.5	38.1	53.5	53.2	85.4	82.3	100			
		X.t	50.0	50.2	50.3	48.0	40.3	40.7	40.7	43.4	42.2	42.2	41.6	39.1	52.9	53.2	85.6	84.9	93.3	100		
		H.s	47.8	48.1	48.1	48.1	39.6	39.3	41.2	41.2	40.6	40.9	40.2	37.7	44.3	46.9	51.9	53.7	54.7	53.5	100	

The percentage of amino acid identity between proteins was determined by pairwise alignment using Clustal W2 software on the EMBL-EBI Internet site. The accession numbers of the different adenosine member clones are given in Supplementary Table S1 and in the legend of Fig. 2

*H.s* Homo sapiens, *X.l* Xenopus laevis, *X.t* Xenopus tropicalis

identity with the three other *X. laevis* adenosine receptors. ADORA1 protein is the most conserved receptor during vertebrate evolution with *X. laevis* and human proteins sharing 68.4 % of identity (Table 3). The three *adora3* proteins are the least conserved receptors, showing less than 55 % with the human ADORA3 protein. Among these three receptors, the *adora3.3* is the most conserved, sharing 93.2 and 54.7 % of identity with its orthologous *X. tropicalis* and human sequence.

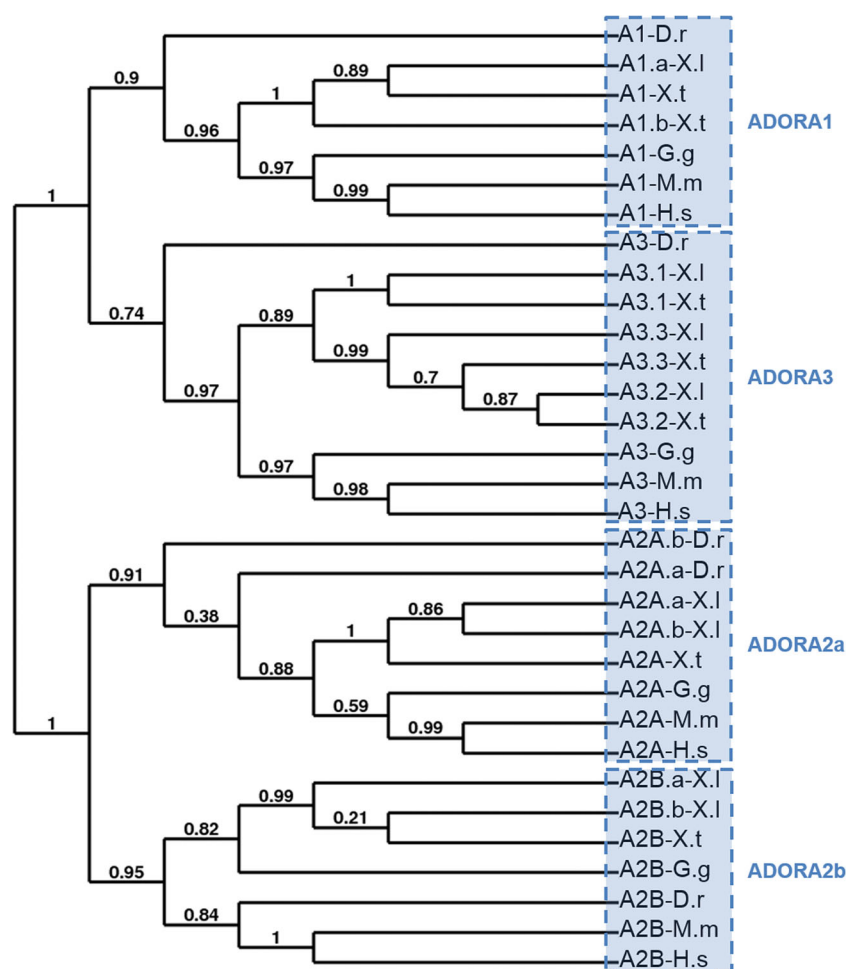
We confirmed the conservation of *ADORA* genes in the vertebrate lineage at the genomic level (Fig. 2b). The synteny is conserved for each *ADORA* gene, confirming that the identified amphibian sequences are true orthologs of the human adenosine receptors. However, the *adora3* gene has been duplicated in amphibian species and the orientation of these genes is different in the *X. tropicalis* genome.

#### Adenosine degradation

We identified two genes, named *ada.1* and *ada.2*, coding for *ada* enzymes in *X. tropicalis* and three in *X. laevis*, called *ada1.a*, *ada1.b*, and *ada.2*. Synteny analysis confirmed the

conservation of these genes during vertebrate evolution and a duplication event in the amphibian lineage (Supplementary Fig. S3a). Phylogenetic analysis demonstrated that each *Xenopus ada* gene is more related to its amphibian orthologs than to its paralog (Supplementary Fig. S3b). Indeed, *Xenopus ada.1* proteins share around 95 % of identity but less than 70 % of identity with amphibian *ada.2* (Supplementary Table S5). Moreover, the phylogenetic tree shows a clear separation between the non-mammalian and the mammalian ADA proteins (Supplementary Fig. S3b). *Xenopus ada.1* proteins are more related than *Xenopus ada.2* proteins to the human enzyme, with a percentage of identity of 69 versus 57.8 % (Supplementary Table S5).

We identified one *pnp* gene in *X. tropicalis* and the two homologs *pnp.a* and *pnp.b* in *X. laevis*. Our genomic sequence analysis allowed us to complete the published *pnp.a* 3' end sequence [32]. Moreover, we identified a putative exon, encoding 34 extra amino acids in the *pnp.a* N-terminal region, which are not conserved in any other PNP sequences. We decided to carry out our study without this extra sequence. The two *X. laevis pnp.a* and *pnp.b* homeologs encode highly similar proteins, sharing 90 % of identity and with only 31



**Fig. 2** Conservative evolution of *ADORA* receptor genes. **a** Phylogenetic tree of vertebrate *ADORA* (A) protein. A phylogenetic tree was constructed on the Phylogeny.fr platform. A cluster algorithm was used to build the tree. Likelihood ratio is indicated at each node of the tree. The GenBank accession numbers of *ADORA* proteins are given in Supplementary Table S1 and as follows: A1-D.r: NP\_001122056; A1-G.g: NP\_989647; A1-M.m: NP\_001008533; A1-H.s: NP\_001041695; A2a.a-D.r: NP\_001034904; A2a.b-D.r: NP\_001035125; A2a-G.g: XP\_425280; A2a-M.m: NP\_033760; A2a-H.s: NP\_001041695; A2b-D.r: NP\_001034902; A2b-G.g: NP\_990418; A2b-M.m: NP\_031439; A2a-H.s: NP\_000667; A3-D.r: XP\_700086; A3-G.g: NP\_989482; A3-M.m: NP\_033761; A3-H.s: NP\_000668. **b** Synteny map for the *ADORA*

receptor genes in vertebrate genomes. The map was generated by comparison of *X. tropicalis*, *G.gallus*, *M.musculus*, and *H.sapiens* chromosome regions containing *ADORA1* (A), *ADORA2A* (B), *ADORA2B* (C) and *ADORA3* (D) genes. The NCBI GeneID of *ADORA* (A) genes is given in Supplementary Table S1 and as follows: A1-G.g: 374212; A1-M.m: 11539; A1-H.s: 134; A2a-G.g: 427705; A2a-M.m: 11540; A2a-H.s: 135; A2b-G.g: 395971; A2b-M.m: 11541; A2b-H.s: 136; A3-G.g: 373956; A3-M.m: 11542; A3-H.s: 140. Each conserved gene is color-coded; the unconserved genes are indicated by white boxes. The orientation of the genes on the different chromosome (chr) or scaffold (scaf) is indicated. D.r *Danio rerio*; G.g: *Gallus gallus*; H.s, *Homo sapiens*; M.m, *Mus musculus*; X.l, *Xenopus laevis*; X.t, *Xenopus tropicalis*

amino acid differences along their coding region (Supplementary Fig. S4 and Supplementary Table S6). Sequence analysis showed that there are 43 amino acid differences (substitution and deletion) between *X. laevis* pnp.a and *X. tropicalis* pnp but only 32 differences between *X. laevis* pnp.b and *X. tropicalis* pnp proteins (Supplementary Fig. S4a). As expected, the percentage of identity between *X. laevis* pnp.b and *X. tropicalis* pnp is higher than the one between *X. laevis* pnp.a and *X. tropicalis* pnp (Supplementary Table S6). However, the percentages of identity between *X. laevis* pnp.a or pnp.b and human PNP are very similar. The phylogenetic tree shows clearly that the two

pnp *X. laevis* sequences are derived from one *X. tropicalis* sequence, which has diverged from the other vertebrate sequences (Supplementary Fig. S4b).

#### Adenosine transporters

All members of the *SCL28* and *SCL29* gene families, excepted for *SLC28A1* and *SLC29A4*, were cloned in *X. laevis* and *X. tropicalis*. We have identified homeologs genes encoding the *X. laevis* slc29a1 and slc29a3 transporters, which we named *slc29a1.a* and *slc29a1.b*, and *slc29a3.a* and *slc29a3.b*. The two slc29a1 proteins are

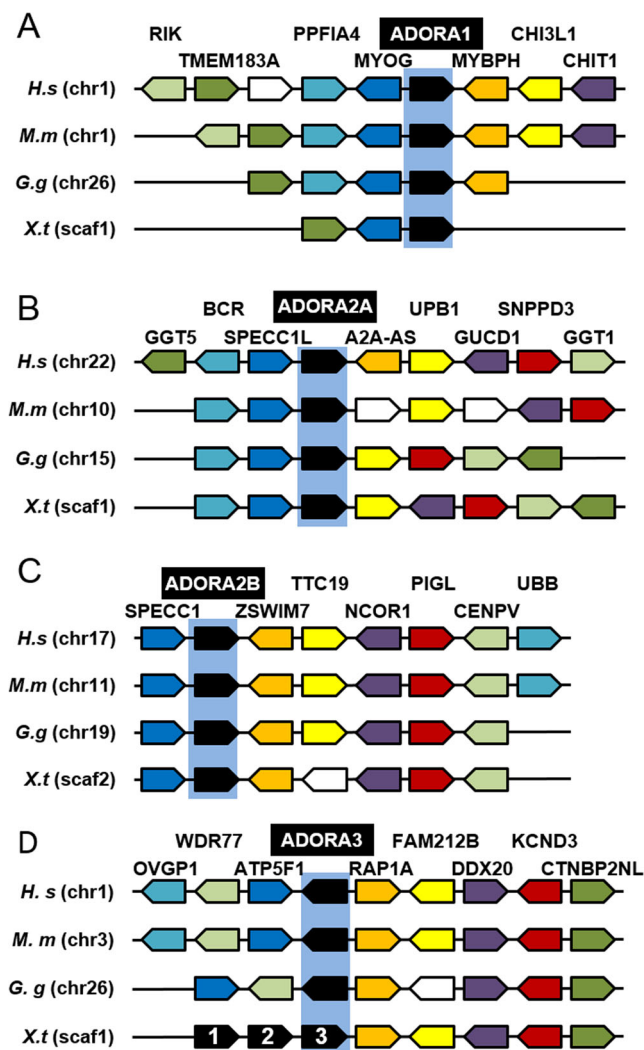


Fig. 2 (continued)

91.8 % identical, but sequence analysis suggests that *slc29a1.b* is more related to its *X. tropicalis* and human orthologs than *slc29a1.a* (Supplementary Table S7). The *X. laevis* *slc29a3.a* and *slc29a3.b* transporters are less conserved, sharing less than 90 % of identity.

The phylogenetic trees illustrate clearly the relatedness of each transporter family (Fig. 3). Each member of these gene families is more related to its orthologs than to the other family members in the same species. Although four branches can be distinguished in the SLC29A family, there are clearly two major subgroups, with SLC29A1, SLC29A2, and SLC29A3 belonging to the first group and SLC29A4 forming the second group (Fig. 3a). The phylogenetic analysis shows the three *Drosophila melanogaster* SLC29A proteins in this tree, but our analysis suggest that these sequences were certainly wrongly annotated. The existence of two major subgroups in the SLC28A family can also be proposed, with SLC28A1 and 2 forming the first group and SLC28A3 the second group (Fig. 3b). These results are supported by the amino acid

conservation studies (Supplementary Tables S7 and S8). Synteny analyses confirmed the vertebrate conservation of these *SLC28A* and *SLC29A* gene families (Supplementary Figs. S5 and S6).

#### Spatial expression profiles of adenosine pathway genes in the adult frog

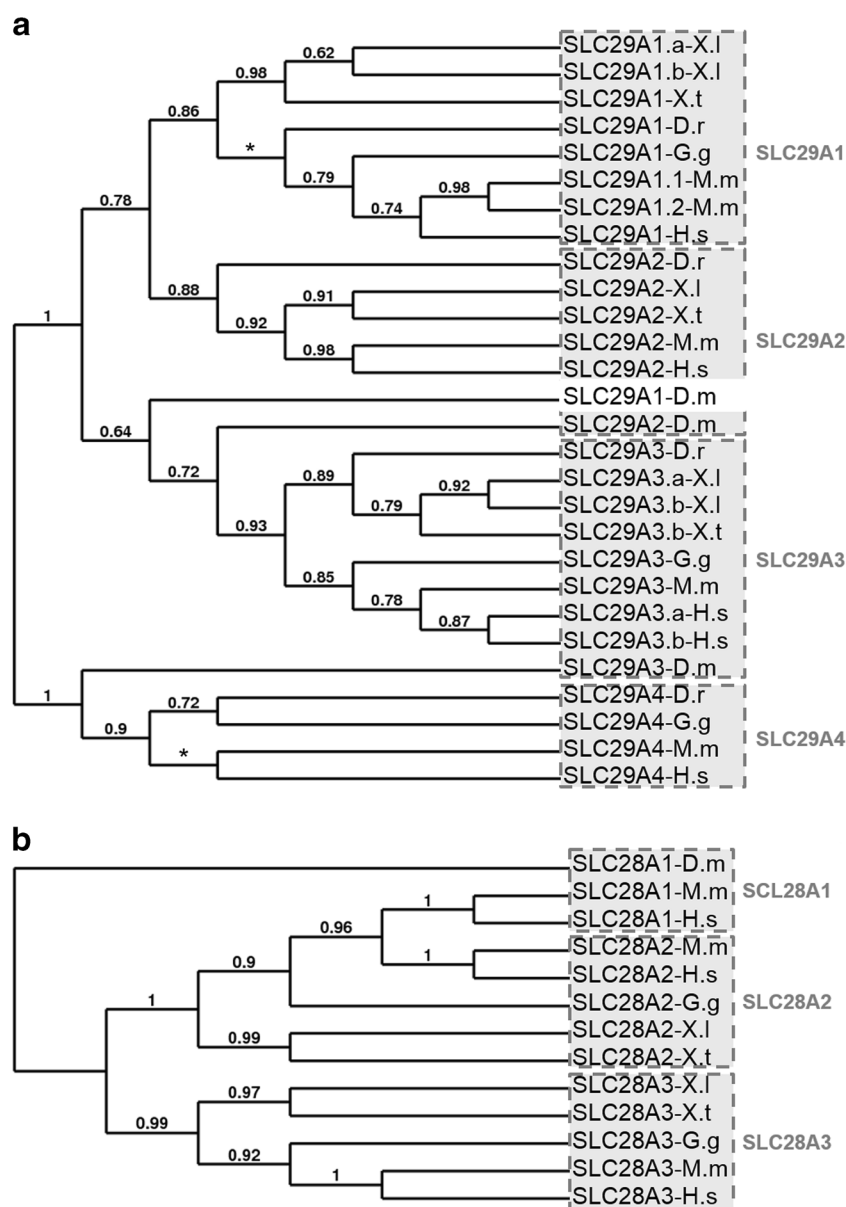
The expression of the different genes in the adult frog was analyzed by RT-PCR (Fig. 4). As the *X. laevis* genome sequencing is not complete and because of the high level of sequence identity between duplicate genes, we were not able to amplify all the identified members listed in the Table 1. However, we tried at least to amplify each couple of homeologs and the duplicate genes, except for *adora3.2*. To distinguish the expression profile of the *pnp* homeologs, we managed to amplify both *pnp* genes and specifically *pnp.b* gene and considered that any expression profile differences might be due to *pnp.a* expression.

All of the adenosine signaling pathway members are expressed in the adult frog and display different expression patterns. The genes coding for enzymes able to generate adenosine appeared to be expressed in a wide range of organs in the adult frog, except for the intestinal alkaline phosphatase *alpi.1* and *alpi.2* genes that are highly expressed in the duodenum. However, these genes are also expressed at a high level in the kidney and liver for *alpi.1* and in the brain for *alpi.2*.

The *adora* genes, except for *adora3.3*, are ubiquitously expressed and their transcripts can be detected in every tested organ, except for the liver for *adora1* and in the eye for *adora3.1*. *Adora3.3* displays a more restricted expression pattern as its expression is only detected at a high level in the bladder and duodenum and at a very low level in the brain, muscle, and stomach.

The genes encoding enzymes involved in adenosine degradation display a wide expression pattern and are expressed at a high level in the kidney. The two *ada* genes display a similar expression profile as their transcripts can be detected in all tested tissues. However, the level of expression for each of these genes is higher in some organs with *ada.2* expression higher in the eye, bladder, liver, and stomach and *ada.1* expression higher in the ovary. Both *pnp* genes are highly expressed in most tissues, except for the muscle, heart, and eye. Their high level expression in the testis, ovary, liver, and spleen is certainly due to *pnp.a* expression, as *pnp.b* expression is faintly detected in these tissues.

The three members of the *slc29a* family display a wide expression profile, being expressed in every organ analyzed. In contrast, the *slc28a* transporter transcripts can only be detected in a few organs. *Slc28a2* is highly expressed in the kidney and duodenum while *slc28a3* expression is mainly detected in the eyes, testis, and kidney.



**Fig. 3** Conservative evolution of the two nucleoside transporter family genes. The phylogenetic trees of vertebrate equilibrative nucleoside transporter (SLC29A) (a) and concentrative nucleoside transporter (SLC28A) (b) were constructed on the Phylogeny.fr platform. A cluster algorithm was used to build the tree. Likelihood ratio is indicated at each node of the tree. The star represents a trifurcation (likelihood ratio null). The GenBank accession numbers of nucleoside transporter proteins are given in Supplementary Table S1 and as follows: SLC29A1-D.m: NP\_722628 (isoform A); SLC29A1-D.r: NP\_001025348; SLC29A1-G.g: XP\_419491 (isoform 6); SLC29A1.1-M.m: NP\_001186042; SLC29A1.2-M.m: NP\_001186044; SLC29A1-H.s: NP\_001071642 (isoform 4); SLC29A2-D.m: NP\_609049; SLC29A2-D.r: NP\_001012519; SLC29A2-M.m: NP\_031880; SLC29A2-H.s: NP\_001523; SLC29A3-

D.m: NP\_648608 (isoform A); SLC29A3-D.r: XP\_005156582; SLC29A3-G.g: XP\_421594; SLC29A3-M.m: NP\_076085; SLC29A3.a-H.s: NP\_060814; SLC29A3.b-H.s: NP\_001167569; SLC29A4-D.r: NP\_001074041; SLC29A4-G.g: XP\_004945212 (isoform 4); SLC29A4-M.m: NP\_666369; SLC29A4-H.s: NP\_001035751; SLC28A1-D.m: NP\_610447; SLC28A1-M.m: NP\_001004184; SLC28A1-H.s: NP\_004204; SLC28A2-G.g: XP\_004943665 (isoform 6); SLC28A2-M.m: NP\_766568; SLC28A2-H.s: NP\_004203.2; SLC28A3-G.g: XP\_425033 (isoform 6); SLC28A3-M.m: NP\_071712; SLC28A3-H.s: NP\_071410. D.r, *Danio rerio*; G.g, *Gallus gallus*; H.s, *Homo sapiens*; M.m, *Mus musculus*; X.l, *Xenopus laevis*; X.t, *Xenopus tropicalis*

Temporal expression profiles of adenosine pathway genes in the *X. laevis* embryos

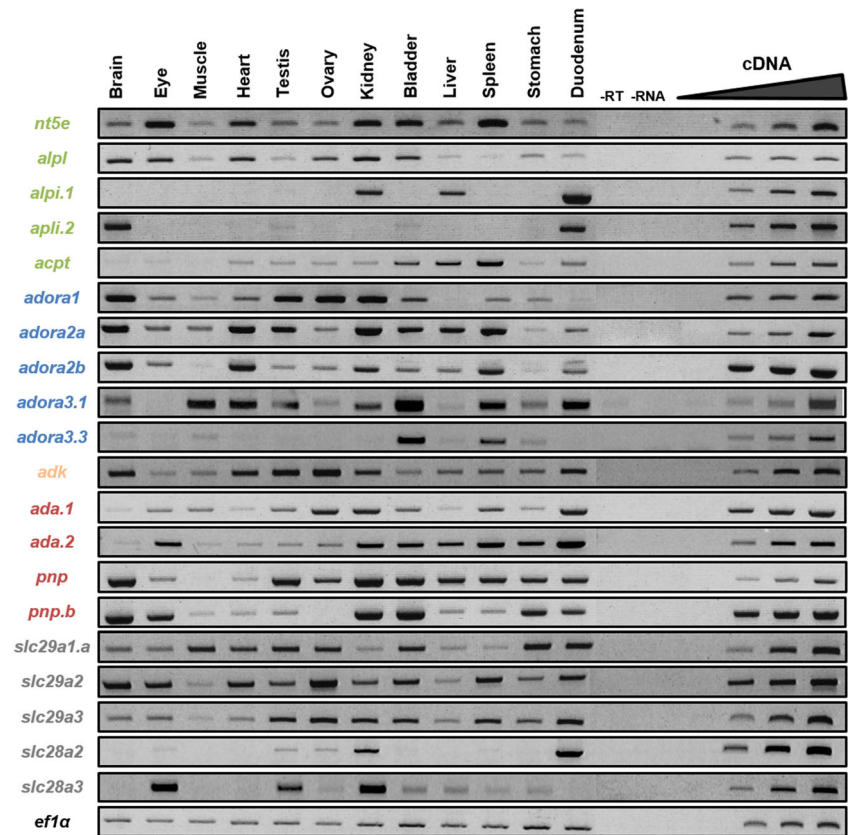
The temporal expression profile of the genes was assessed by RT-PCR using whole unfertilized eggs and embryos from

stage 5 to stage 41 in order to cover all embryonic phases of *X. laevis* development (Fig. 5).

The genes encoding enzymes generating adenosine are not expressed maternally, except for *acpt*, which is expressed at low level in unfertilized eggs and in stage 5 embryo. *Nt5e*



**Fig. 4** Spatial expression profiles of adenosine pathway actors in adult frog. The expression profile of each gene in adult tissues was determined by RT-PCR. Negative controls (–RT, –RNA) were performed. The linearity was performed with doubling dilutions of cDNA from the following tissues: *adora 1*, *2A*, and *2B* and *slc29a2* with the brain; *ada.2* with the eye; *NT5E* with the heart; *slc29a1* and *slc28a3* with the testis; *pnp* with the ovary; *alpl*, *alpi.1*, *pnp.a*, and *slc28a2* with the kidney; *adora3.1* and *3.3* with the bladder; *acpp* with the liver; *ada.1* and *slc29a3* with the spleen; and *alpi2* and *adk* with the duodenum. *Ef1 $\alpha$*  was used as a loading control. Adenosine production enzymes are in green, adenosine receptors are in blue, adenosine degradation enzymes are in orange (intracellular) and red (extracellular), and nucleoside transporters are in gray



expression starts to be detected during neurulation and the expression level decreases during organogenesis, from stage 21 to 35/36 before a re-increase from stage 37/38. The zygotic alkaline phosphatase *alpl* is expressed from stage 9 and remains constant until stage 41. No expression at any embryonic stage tested could be detected for *alpi.1* whereas the zygotic *alpi.2* expression is only and weakly detected from stage 32. The zygotic expression profile of *acpt* is similar to that of *alpi.2*, one where transcripts are only detected during late organogenesis phase.

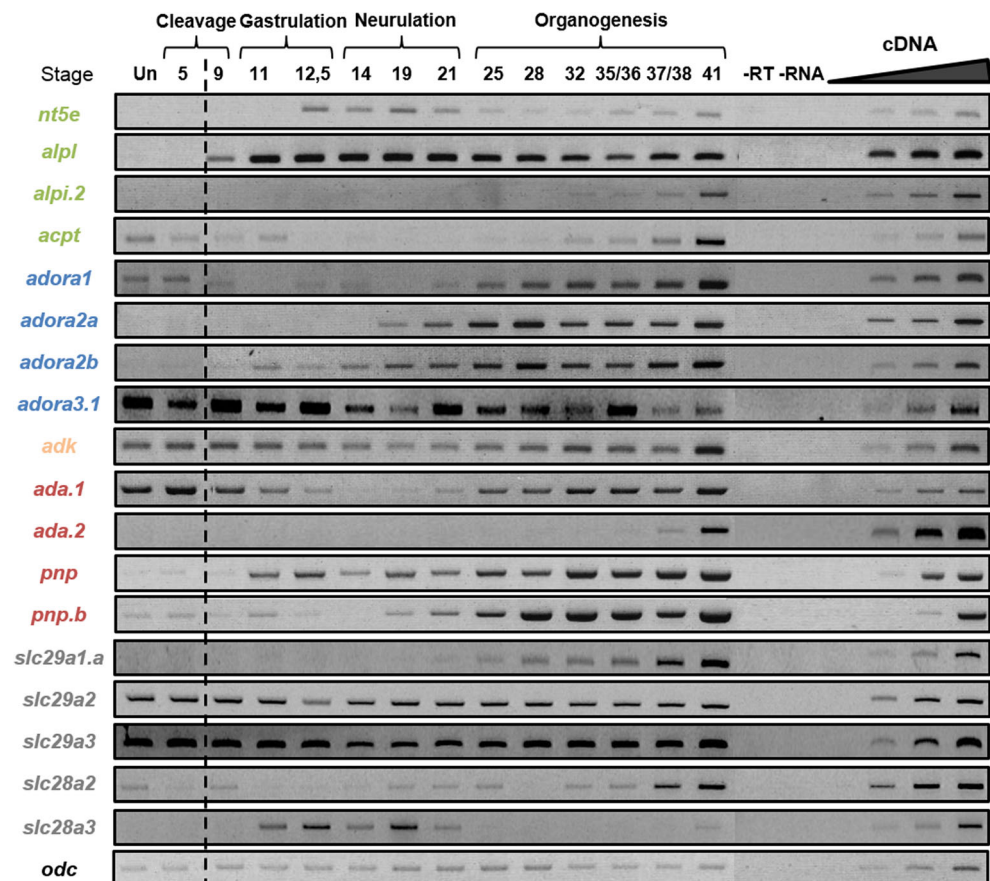
The *adora* receptors encoding genes display distinct temporal expression profile in *Xenopus* embryos. *Adora2a* and *Adora2b* are not expressed maternally and their zygotic expression is first detected during neurulation and gastrulation, respectively. Their level of expression increases slowly until stage 41. *Adora1* and *adora3.1* are both expressed maternally. The zygotic expression of *adora1* is weakly detected during neurulation, with an increase of expression from stage 25 to stage 41 while *adora3.1* is expressed at all stages of development. No expression of *adora3.3* could be detected at any stage suggesting that *adora3.3* is dispensable for embryogenesis.

In contrast to the genes encoding adenosine-generating enzymes, several genes coding for enzymes metabolizing adenosine are maternally expressed. Indeed, expression of *adk*, *ada.1*, and *pnp* genes is detected in unfertilized eggs

and during early cleavage phases. *Adk* expression is detected at all tested stages with a dynamic expression pattern. After a decrease of maternal expression from unfertilized egg to the end of neurulation, *adk* expression level increases slowly during organogenesis until stage 41. The two *ada* genes display also different expression profiles during *X. laevis* embryogenesis. *Ada.1* maternal expression is detected until the end of gastrulation while zygotic expression is first detected at the end of neurulation. On the contrary, *ada.2* expression is only detected at the end of embryonic development. *Pnp* gene expression is detected at all stages tested with maternal contribution being low whereas the zygotic expression level increases until the end of organogenesis. Zygotic *pnp.b* expression is only weakly detected during gastrulation and neurulation phases but is upregulated at stage 19 and increases until stage 41. Therefore, the *pnp* transcripts amplified during gastrulation and neurulation phases might correspond to *pnp.a* expression.

The equilibrative and concentrative nucleoside transporter family members display different expression profiles during *X. laevis* embryogenesis. The *slc29a* genes can be divided into two groups according to their expression patterns. The first group includes *slc29a1.a* which is not expressed maternally and whose zygotic expression is only detected during organogenesis. The second group is composed of *slc29a2* and *slc29a3*, which are expressed at a similar level at all stages

**Fig. 5** Temporal expression profiles of adenosine pathway actors during embryogenesis. The expression profile of each gene was determined by RT-PCR from cDNA of unfertilized egg (*Un*) and whole embryo at different stages covering the different phases of *X. laevis* embryogenesis. Negative controls (–RT, –RNA) were performed. Mid-blastula transition is indicated by the dotted line. The linearity was performed with doubling dilutions of cDNA from stages 37–38, except *acpt* and *adk* with stage unfertilized; *slc28a3* with stage 11; *nt5e* with stage 14; *adora3.1* and *slc29a3* with stage 21; *slc29a1* and *slc29a2* with stage 32; and *alpi.2*, *ada.2*, and *slc28a2* with stage 41. *Odc* was used as a loading control. Adenosine production enzymes are in green, adenosine receptors are in blue, adenosine degradation enzymes are in orange (intracellular) and red (extracellular), and nucleosides transporters are in gray



tested. The *slc28a* genes display distinct expression profile where *slc28a2* is weakly maternally expressed and then its zygotic expression level increases from the end of neurulation until stage 37/38, whereas *slc28a3* is only expressed during gastrulation and neurulation phases.

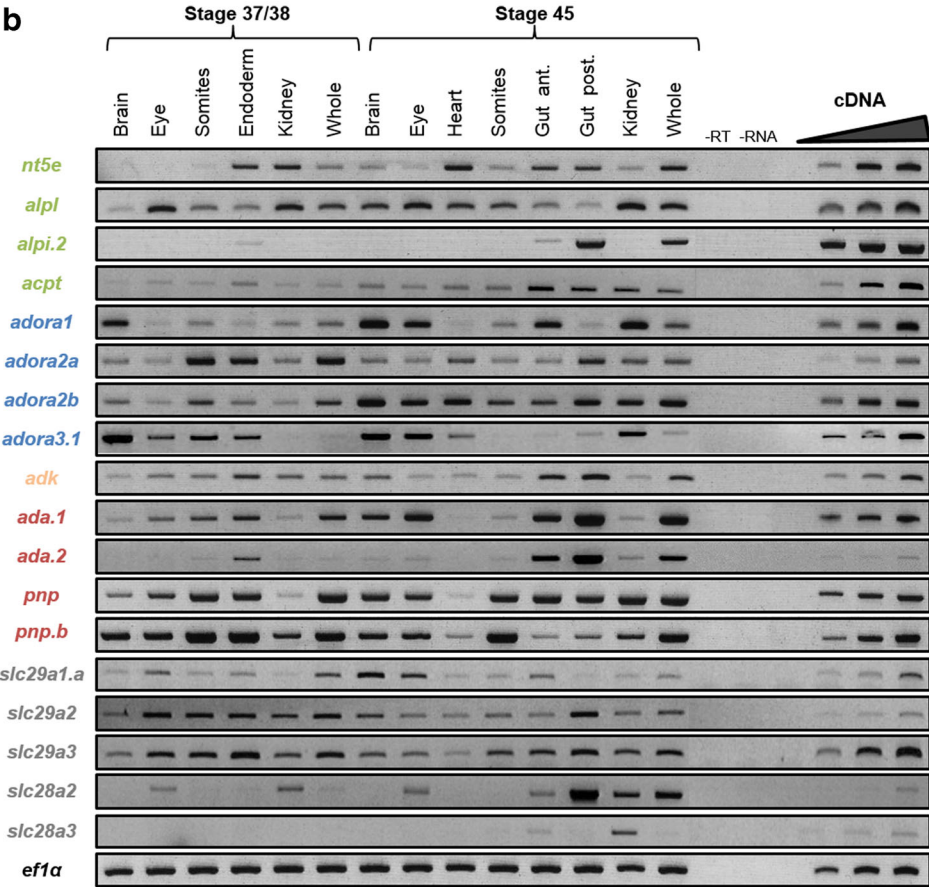
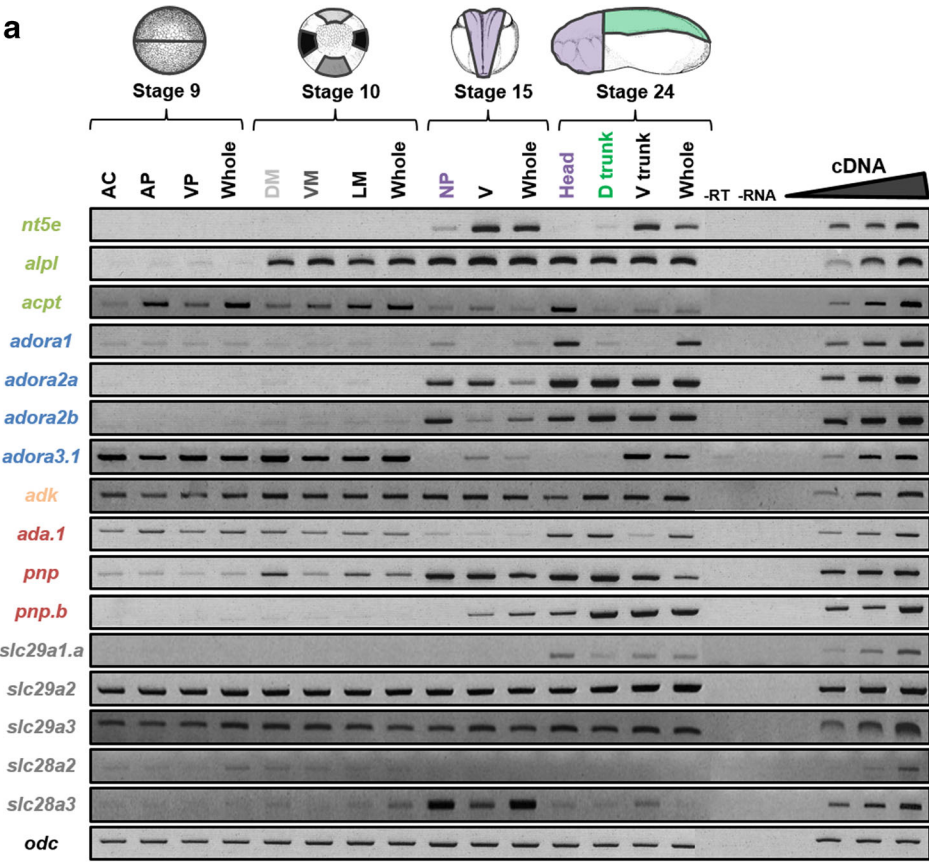
#### Spatial expression profiles of adenosine pathway genes during development of *X. laevis*

The spatial expression of the genes was assessed by RT-PCR on a series of *X. laevis* embryo dissections as indicated in Fig. 6. The presumptive nervous system was dissected from the rest of the embryo at stage 9 (animal cap) and stage 15 (neural plate). At stage 10, the different mesodermal tissues (dorsal, lateral and ventral) were dissected. At stage 24, the brain and anterior structures (head) and spinal cord with somitic tissues (dorsal trunk) were separated from the ventral region of the embryo (ventral trunk) (Fig. 6a). At later stages, selected organs were isolated from stage 37/38 and stage 45 embryos (Fig. 6b).

Among the genes encoding enzymes involved in adenosine production, *nt5e* displays the most restricted expression profile in the early phases of embryogenesis, with no expression or at low level in neural and somitic tissues (Fig. 6a). At late organogenesis stages, *nt5e* transcripts are detected in

mesodermal derived tissues such as the heart and kidney and also endodermal derived tissues (Fig. 6b). *Alpl* is ubiquitously

**Fig. 6** Spatio-temporal expression profiles of adenosine pathway actors in dissected embryos. The expression profile of each gene was determined by RT-PCR from cDNA of **a** dissected tissues of a blastula (stage 9), gastrula (stage 10), neurula (stage 15), and tadpole (stage 24) as illustrated on the schematic embryos, and **b** dissected tissues of tadpoles (stages 37/38 and 45). Amplification from cDNAs of whole embryos was used as a control. Negative controls (–RT, –RNA) were also performed. Linearity was performed with doubling dilutions of cDNA from the following tissues: (panel **a**) *enpp2B*, *ADORA3.1*, *ADA.1*, *ADK*, and *SLC28A2* with whole embryo st9; *ALPL* and *ACPT* with whole embryo st10; *SLC28A3* whole embryo st15; *ADORA1* and *PNP* with head st24; *ADORA2B* with somites st24; *nt5e* and *ADORA2A* with rest st24; and *PNP.a*, *SLC29A1*, 2, and 3 with whole embryo st24. (Panel **b**) *SLC29A2* with brain st37; *PNP.a* with somites st37; *nt5e* with endoderm st37; *ALPL* and *ADORA2A* with kidney st37; *ADK* and *SLC28A2* with whole embryo st37; *ADORA1*, 2, 3.1 and *ADA.1* with brain st45; *ADA.2* with eye st45; *PNP* with somites st45; *enpp2B*, *ACPT* and *SLC29A1* with anterior gut st45; *ALPL.2* and *SLC29A3* with posterior gut st45; and *SLC28A3* with whole embryo st45. *Odc* and *ef1α* were used as loading controls. *AC* animal cap, *AP* animal pole, *DM* dorsal mesoderm, *D Trunk* dorsal trunk, *Gut Ant.* anterior gut, *Gut Post.* posterior gut, *LM* lateral mesoderm, *NP* neural plate, *VM* ventral mesoderm, *VP* vegetative pole, *V Trunk* ventral trunk. Color code of adenosine pathway actors: adenosine production enzymes in green, adenosine receptors in blue, adenosine degradation enzymes in orange (intracellular) and red (extracellular), and nucleosides transporters in gray





expressed from the end of cleavage (stage 10) until the beginning of organogenesis (stage 24) (Fig. 6a). At stage 37/38, *alpl* expression remains detected in all dissected regions tested, but at a higher level in the eye and kidney (Fig. 6b). At the end of embryogenesis, *alpl* transcripts are detected in all tissues analyzed although at a weaker level in the posterior gut. As expected, the intestinal alkaline phosphatase *alpi.2* is highly and specifically expressed in the posterior gut at stage 45 (Fig. 6b) but with a weaker expression in the ventral region of stage 37/38 embryo and in stage 45 anterior gut. The acid phosphate *acpt* displays a ubiquitous expression profile except at stage 24, with a high expression in the head (Fig. 6).

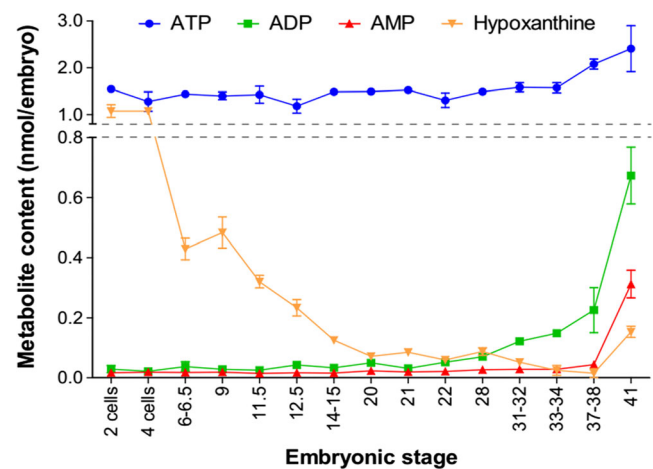
Based on their expression profiles during the early phases of embryogenesis, the *adora* receptors can be divided into three groups (Fig. 6a). *Adora1* gene constitutes the first group and is ubiquitously and weakly expressed in blastula and gastrula stage embryo, and then, its expression becomes restricted to the nervous system from neurula stages. The second group is composed of *adora2a* and *adora2b*, which are expressed in all dissected regions of stages 15 and 24 embryo. *Adora3* belongs to the third group and is ubiquitously detected in stages 9 and 10, but in stage 15 embryo, it becomes the only adenosine receptor not expressed in neural tissues. At later stages, *adora* genes display a ubiquitous expression profile and are all expressed in the brain and eye (Fig. 6b).

Genes encoding enzymes involved in adenosine catabolism, except for *ada.2*, are ubiquitously expressed in *X. laevis* embryo, although their expression level may vary between dissected regions (Fig. 6). *Ada.2* is only expressed at late stages with a highly level detected in the endodermal tissues (Fig. 6b).

The *slc29a* genes are expressed ubiquitously in embryos, although *slc29a1.a* expression seems more restricted to the nervous system (Fig. 6). *Slc28a* genes display a more stage and tissue specific expression profile. *Slc28a3* transcripts are highly detected in the neural plate in neurula stage embryo and in stage 45 kidney. *Slc28a2* transcripts are found in renal tissues and in dissected eyes at late organogenesis phases.

#### Concentration of adenosine compared to other purines during *Xenopus* development

The embryonic content of ATP and its derivatives was measured by liquid chromatography from two-cell stage to stage 41 in order to cover all *X. laevis* embryonic development (Fig. 7). The ATP content remains constant at around 1.3 nmol/embryo until stage 33/34, before an increase during late phases of organogenesis to reach 2.4 nmol/embryo. ADP and AMP contents remain low during early phases of development but increase from stage 37/38 (>0.04 nmol/embryo) to reach 0.7 and 0.3 nmol/embryo, respectively, at stage 41. In two-cell-stage embryo, hypoxanthine and ATP contents are similar (around 1 nmol/embryo) before a dramatic drop of hypoxanthine from four-cell-stage embryos to reach its lower



**Fig. 7** Evolution of purine content in embryo during development. Total embryo extracts were prepared from indicated stages, and metabolites were separated and quantified by liquid chromatography. Each point corresponds to the mean of 3 to 8 extractions done on independent batches of embryos (10 embryos per extract) and from two independent females. Error bars indicate variation to the mean

value of 0.01 nmol/embryo in stage 37/38 embryo, before a slight re-increase. Adenosine and inosine contents are undetectable during *Xenopus* development, with a value inferior to the detection value limit of the technique (<1 pmol/embryo for these two metabolites).

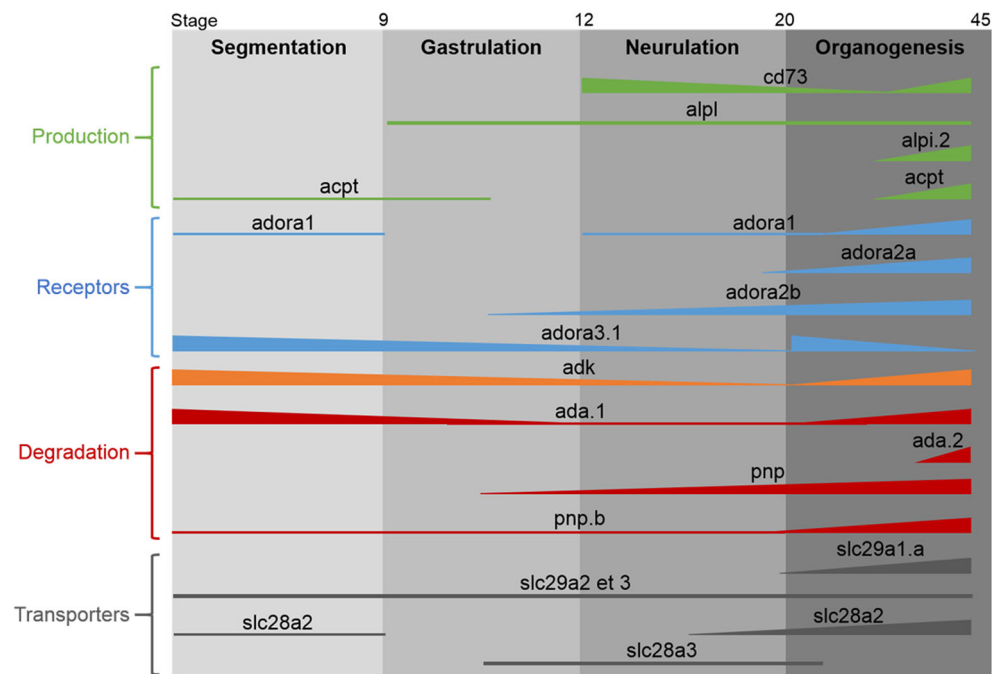
## Discussion

In this paper, we report the identification and expression in *X. laevis* embryo and adult of thirteen enzymes involved in the metabolism of adenosine, of nine *adora* receptors, and of the seven nucleoside transporters. Although the sequences for the majority of these members were available on Xenbase, none of their embryonic expression profile had been characterized yet, except for *pnp* and *adora2a* [32, 33]. The expression profiles for some of the genes analyzed were achieved through a comparative transcriptome study [43]. However, our data not only confirmed their results, available on Xenbase website, but is also more complete including later developmental stages. Although we have not analyzed the expression profiles of all the identified members of the adenosine signaling pathway, we were able through our in-depth analysis to provide the first comparative and comprehensive expression map (Fig. 8).

Evolutionary conserved members of the adenosine signaling pathway are present in *Xenopus*

Our study reveals that all the identified members regulating this pathway (see Table 1) are present in *X. laevis* and

**Fig. 8** Comparative map of the expression profiles of the members forming the adenosine signaling pathway during *X. laevis* development. The *full lines* represent the expression for each gene detected in the study whereas the *dotted lines* represents the expression for which the level may be too low for being detected by our RT-PCR. The thickness of the lines indicates the expression level of each gene



*X. tropicalis* except for four actors. As expected, no amphibian orthologous were found for human placental and germ cell alkaline phosphatases, the two mammalian specific enzymes. Our BLAST genomic search failed to identify amphibian sequences encoding the transporters *SLC28A1* and *SLC29A4*. However, our study revealed the presence of *slc29a1* and *slc29a3* homeologs that may compensate for the loss of *slc29a4* gene. Bioinformatic analyses indicate that all amphibian *slc29a*, as their mammal orthologs, display the characteristic 11 transmembrane domains (TM) of these transporters. Moreover, the residues important for mammalian *slc29a* functions are conserved in the amphibian sequences, such as G79 (numbered on the human *SLC29A1* sequence), which is involved in transport activity [44]. The residue 33 is a determinant of overall functional difference between *SLC29A1* and *SLC29A2* [45]. In human *SLC29A2*, this residue, an isoleucine, is a functional determinant for purine nucleoside transport and is conserved in both *X. laevis* and *X. tropicalis* sequences. In the three amphibian *slc29a1* sequences, this residue is a methionine as in human *SLC29A1*. Interestingly, this residue, which is also an isoleucine in human *SLC29A3* sequence, is not conserved in *X. laevis* and *X. tropicalis* *slc29a3* proteins. No duplicated genes were identified for *slc28a2* and *slc28a3*. The residues 319 and 353 (numbered in human *SLC28A1*) are involved in pyrimidine and purine selectivity [46], and the presence of glycine and serine respectively at these positions in all *Xenopus* *slc28a* sequences suggests that these transporters may be purine selective. Thus, this may compensate for the absence of *slc28a1* which, although

being pyrimidine selective, can transport adenosine in a high-affinity, low-capacity manner [46].

Surprisingly, nine *adora* receptors are present in *X. laevis*, with three homeologs and three duplicated *adora3* genes. Bioinformatic analysis indicated that all of the receptors display the characteristic 7 TM domains of these receptors, each 21 to 28 amino acids long [47]. As for their mammalian orthologs, the percentages of identity between the different *Xenopus* *adora* proteins are weak, ranging from 45 to 50 %. However, the residues in the TM essential for ligand recognition, such as A66, T91, M180, W247, N254, I274, and H278 (numbered on the human *ADORA1* sequence), are conserved in all *Xenopus* *adora* receptors [20].

Ada enzyme is another member of the adenosine pathway that has been duplicated in *Xenopus*. Moreover, the *ada.1* homologs have been conserved, making to three the number of *ada* proteins in *X. laevis*, suggesting the importance of this enzyme. Several residues have been characterized to be essential for adenosine deaminase activity [48–50]. The majority of these residues, especially G184, E217, and D295 (numbered on human *ADA* gene), are conserved in all *Xenopus* *ada* sequences [50]. Surprisingly, D296, which is required for proper binding of the substrate in the active site, is not conserved in *ada.2* proteins. This difference may suggest different catalytic properties for the amphibian *ada.1* and *ada.2* enzymes.

Our study reveals that each member of the amphibian adenosine signaling pathway is more related to its orthologs than to other family members in the same species. This suggests that any future functional test performed in *X. laevis* will be relevant to a conserved function in other vertebrates.

## Several duplicate members in *Xenopus*

Among the 29 members of the adenosine signaling pathway identified in this study, 7 are duplicate genes also found in *X. tropicalis*, arisen from a duplication event that has taken place before *X. laevis* and *X. tropicalis* divergence 50 million years ago, and 7 are homeologs which arose from the duplication of the two parent species 40 million years ago [51]. Although we may have not identified all the homeolog sequences, our work demonstrates that 39 % of the duplicate genes of this pathway have been conserved and encode proteins sharing 91 to 97 % of amino acid identity. This is in agreement with previous bioinformatics analyses [42]. However, Morin et al. demonstrate that one of the gene ontology categories that have lost the tetraploidization-derived paralog is nucleoside metabolism [52]. Indeed, only two enzymes have kept their duplicate gene whereas three out of the four adora receptors and two out of the three slc29a transporters are present with their homeologs.

These duplicated genes may be functional, and because they display different expression pattern, they might have acquired sub-functionalization. Although we could not analyze the expression profiles of all of them because of the lack of specific sequences, we show that *pnp.a* and *pnp.b* have distinct expression profiles, suggesting that these 2 proteins may fulfill different parts of their original ancestral function. Three *adora3*, two *alpi*, and two *ada* duplicates were identified in both *Xenopus* species. Two intestinal alkaline phosphatases, *Alpi.1* and *Alpi.2*, are also present in mouse, chick, and zebrafish. In mice, these two genes have been shown to have distinct expression profiles and regulation suggesting different biological functions [53]. We show here that these two genes have distinct expression profiles during *X. laevis* development. In adult, they are highly expressed in adult *X. laevis* intestine but each *alpi* gene is also expressed in the kidney or brain. This second domain of expression, specific to each *Xenopus* duplicate gene, has been identified for human ALPI via ESTs sequences, indicating sub-functionalization (Unigene Hs39009). To our knowledge, the *ADORA3* and *ADA* genes have not been duplicated in other vertebrate species and no information is available regarding a physiological relevance for their duplication in *Xenopus*. However, we show that these genes are differentially expressed in amphibian adult and embryos, suggestive of sub-functionalization.

## Specific functions for the different members in *Xenopus*

The majority of the former descriptive studies on adenosine signaling pathway actors have been carried out in adults. Our work shows that the majority of these genes are expressed ubiquitously in the adult frog, although their expression level

may vary between tissues. Similar expression profiles have been shown for their mammalian ortholog genes, such as *SLC29A*, *PNP*, *ADA*, and *ADK* [44, 54, 55]. However, less is known regarding the expression profile of these actors during vertebrate development. Our present work shows that these members can be divided into five groups based on their embryonic temporal expression (Fig. 8). (1) The first group includes genes such *alpi.1*, *alpi.2*, *adora3.3*, and *ada.2* whose expression pattern precludes any roles during *Xenopus* development. No ESTs encoding the enzymes ALPI or the receptor Adora3 have been identified during mouse development (Mm. 58068 and Mm.235024), and only ESTs from organogenesis phase have been found for the enzyme Ada (Unigene Mm.388), suggesting that these proteins are not or not much involved in mammal embryogenesis. (2) The second group includes genes such as *adk*, *slc29a2*, and *slc29a3* whose maternal and zygotic expression is constant. These genes are also expressed in all dissected tissues analyzed, suggesting that they may have housekeeping functions in *Xenopus* embryos. Not much information is available regarding their embryonic expression profiles in mammals, but analyses of EST databases and mouse transcriptome revealed that *Adk* is strongly expressed during mouse development whereas the two transporters seem to be weakly or not expressed ([56]; Unigene Mm.188734, Mm.4930, Mm.284462). (3) The third group gathers genes such as *adora2a* and *adora2b* receptors, *slc29a1* transporter, and alkaline phosphatase *alpl* which are not expressed maternally but whose zygotic expression level increases and reaches a maximum level at tadpole stages. These genes are also widely expressed in dissected embryos, although their expression level varies between tissues. The *pnp.a* gene might be part of this group. (4) The fourth group contains genes such as *acpt*, *pnp.b*, *adora1*, *ada1.a*, and *slc28a2*, which are maternally expressed and then zygotically expressed from late neurulation or organogenesis. These genes display a more tissue-specific expression in both embryo and adult, suggesting a specific function. Mouse *Slc28a2* high expression has been reported in gut during organogenesis phase [56], suggesting that it might be implicated in gut formation in vertebrates. Interestingly, *Xenopus acpt* is not highly expressed in frog testis, as its mouse orthologs (Unigene: Mm.367353), ruling out a possible implication in testis physiology as it has been proposed for the human gene [11]. (5) The last group is composed of genes such as *nt5e* and *slc28a3* whose zygotic expression level peaks during neurulation before a decrease during development. The transporter *slc28a3* is highly expressed in the neural plate, suggesting a role in neural tissues formation. However, in mouse, *Slc28a3* expression has only been detected in morula and blastocyst stages (Mm.18188). Surprisingly, *nt5e* is not expressed in the developing nervous system but mainly in derivated mesoderm tissues. Similar expression has also been found in mouse, chick, and human embryos [56–58].

## Implication of adenosine during *Xenopus* development

Our measurement of ATP content in the embryo ends up with a value of 1.5 nmol/embryo at two-cell-stage embryo. This is in agreement with other data that measured an ATP content between 0.74 and 1.03 nmol/oocyte [59]. Despite the presence in the embryo of the different ectonucleotidases, entpdases, enpps, and alkaline phosphatases, the content of ATP and other nucleotides remains constant during embryogenesis until stage 37/38. This is quite expected, as a balanced supply of purine nucleotides is needed in growing tissues such as during embryogenesis. The rapid decline of hypoxanthine from 1 nmol/embryo (two-cell stage) to 0.015 nmol/embryo (stage 37/38) suggests that this metabolite is the major source of purines during *X. laevis* development and purine nucleotides are therefore made available for cells via the salvage pathway. Indeed, high level of expression of *hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1* has been detected by RTqPCR during *Xenopus* development [43]. Moreover, it has been shown that an increase in HPRT activity is related to developmental changes [60]. As salvage of the purine ring is six times more efficient in terms of ATP equivalents than de novo purine synthesis, our data suggests that the salvage pathway compensates for the nucleotide requirement to the embryo for growth and development [61].

Our study suggests that the adenosine signaling pathway may regulate the physiology of all *Xenopus* adult organs, in a similar way to mammals [3, 5, 62–64]. In particular, the kidney, intestine, and brain appear to be major sites of expression in the adult for the pathway members, including the enzymes involved in generating or hydrolyzing adenosine, adora receptors and nucleotide receptors. This observation may also account for tadpole's organs. Interestingly, the ectonucleotidase *nt5e* is highly expressed in developing renal tissues and may be therefore involved in pronephric formation. This would not be unexpected as renal dysfunctions have been observed in *Nt5e* null mice [65, 66]. Our data demonstrate that the different actors of the adenosine signaling pathway are present during *Xenopus* development, suggesting that this pathway is functional during vertebrate embryogenesis. This pathway might be particularly involved in the nervous system formation, as several members of this pathway, such as *adora1*, *2a*, and *2b* receptors, are expressed in developing neural tissues. However, our work raises the question of the origin of the extracellular adenosine in this tissue as *nt5e*, the major enzyme producing extracellular adenosine from AMP, is not expressed there [7]. In the adult mouse dorsal spinal cord, the *Alpl*, *Acpt*, and *Nt5e* are the main AMP ectonucleotidases to generate extracellular adenosine [67]. As the *alpl* and *acpt* phosphatases are both expressed in the neural plate, we could speculate that they may act redundantly to generate extracellular adenosine. However, we have previously shown that *enpp2b* is expressed in neural tissues,

placing this enzyme as the potential major source of extracellular adenosine [31]. We have shown that the embryonic expression profiles of the different actors are dynamic and therefore the extracellular/intracellular adenosine content must be tightly regulated temporally and spatially. At late stages of organogenesis, all the different types of actors, e.g., adenosine anabolic and catabolic enzymes, receptors, and nucleotides, are expressed, suggesting that the adenosine signaling pathway is fully on. However, during segmentation, our data suggest that this pathway may be off due to the presence of the catabolic enzymes *adk* and *ada* and the *slc29a* transporters. Moreover, the same observation can be made in the ovary, suggesting that any adenosine molecule can be metabolized into either hypoxanthine or AMP/ADP/ATP, as it has been previously shown in *Xenopus* oocytes [68]. Therefore, during early stages of development, the adenosine content must be low. Indeed, we observed that adenosine content is lower than 0.001 nmol/embryo, which is a very low level compared to the adenylic nucleotide AMP (0.015 to 0.310 nmol/embryo), ADP (0.02 to 0.68 nmol/embryo), and ATP (1.1 to 2.4 nmol/embryo). Therefore, during vertebrate development, a sophisticated regulatory system is probably in place in order to maintain this low level of adenosine. Any disruption of this system would have severe consequences for development. Indeed, addition of exogenous adenosine blocks early development, and increase of adenosine signaling is lethal (reviewed in [69]), these two observations being in good agreement with a regulatory system keeping adenosine at a low level all along the embryonic development.

We have previously published the expression profiles of the entpdase and enpp gene members during *Xenopus* embryos and demonstrated the power of this model to establish previously unknown functions for the purinergic signaling pathway [29–31]. This study brings novel insights into the implications of the purinergic signaling pathway during vertebrate development. Functional analyses to decipher the embryonic roles of extracellular adenosine are in progress in the laboratory.

**Acknowledgments** This work was supported by funding from the University of Bordeaux, the CNRS, and the “Association Française contre les Myopathies.” AT was supported by a PhD fellowship from the French Ministry for Research and Education. The funders had no role in study design, data analysis, or manuscript writing. We thank Lionel Parra Iglesias for taking care of the *Xenopus* colony.

## References

1. Burnstock G (2007) Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* 64(12):1471–1483



2. Vizi ES, Knoll J (1976) The inhibitory effect of adenosine and related nucleotides on the release of acetylcholine. *Neuroscience* 1(5):391–398
3. Burnstock G, Krugel U, Abbracchio MP, Illes P (2011) Purinergic signalling: from normal behaviour to pathological brain function. *Prog Neurobiol* 95(2):229–274
4. Castrop H (2007) Mediators of tubuloglomerular feedback regulation of glomerular filtration: ATP and adenosine. *Acta Physiol (Oxf)* 189(1):3–14
5. Di Virgilio F (2012) Purines, purinergic receptors, and cancer. *Cancer Res* 72(21):5441–5447
6. Glaser T, Cappellari AR, Pillat MM, Iser IC, Wink MR, Battastini AM, Ulrich H (2012) Perspectives of purinergic signaling in stem cell differentiation and tissue regeneration. *Purinergic Signal* 8(3):523–537
7. Zimmermann H, Zebisch M, Strater N (2012) Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal* 8(3):437–502
8. Albright RA, Chang WC, Robert D, Ornstein DL, Cao W, Liu L, Redick ME, Young JI, De La Cruz EM, Braddock DT (2012) NPP4 is a procoagulant enzyme on the surface of vascular endothelium. *Blood* 120(22):4432–4440
9. Stefan C, Jansen S, Bollen M (2006) Modulation of purinergic signaling by NPP-type ectophosphodiesterases. *Purinergic Signal* 2(2):361–370
10. Zylka MJ, Sowa NA, Taylor-Blake B, Twomey MA, Herrala A, Voikar V, Vihko P (2008) Prostatic acid phosphatase is an ectonucleotidase and suppresses pain by generating adenosine. *Neuron* 60(1):111–122
11. Yousef GM, Diamandis M, Jung K, Diamandis EP (2001) Molecular cloning of a novel human acid phosphatase gene (ACPT) that is highly expressed in the testis. *Genomics* 74(3):385–395
12. Yegutkin GG (2008) Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* 1783(5):673–694
13. Park J, Gupta RS (2008) Adenosine kinase and ribokinase—the RK family of proteins. *Cell Mol Life Sci* 65(18):2875–2896
14. Podgorska M, Kocbuch K, Pawelczyk T (2005) Recent advances in studies on biochemical and structural properties of equilibrative and concentrative nucleoside transporters. *Acta Biochim Pol* 52(4):749–758
15. Young JD, Yao SY, Baldwin JM, Cass CE, Baldwin SA (2013) The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. *Mol Aspects Med* 34(2–3):529–547
16. Blackburn MR, Kellems RE (2005) Adenosine deaminase deficiency: metabolic basis of immune deficiency and pulmonary inflammation. *Adv Immunol* 86:1–41
17. Dunwiddie TV, Masino SA (2001) The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 24:31–55
18. Porkka-Heiskanen T, Alanko L, Kalinchuk A, Stenberg D (2002) Adenosine and sleep. *Sleep Med Rev* 6(4):321–332
19. Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Hasko G (2013) CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med* 19(6):355–367
20. Jacobson KA, Balasubramanian R, Deflorian F, Gao ZG (2012) G protein-coupled adenosine (P1) and P2Y receptors: ligand design and receptor interactions. *Purinergic Signal* 8(3):419–436
21. Chen JF, Eltzschig HK, Fredholm BB (2013) Adenosine receptors as drug targets—what are the challenges? *Nat Rev Drug Discov* 12(4):265–286
22. Sperlagh B, Vizi ES (2011) The role of extracellular adenosine in chemical neurotransmission in the hippocampus and Basal Ganglia: pharmacological and clinical aspects. *Curr Top Med Chem* 11(8):1034–1046
23. Yun J, Li J, Zuo Z (2014) Transferred inter-cell ischemic preconditioning-induced neuroprotection may be mediated by adenosine A1 receptors. *Brain Res Bull* 103:66–71
24. Kermer V, Ritter M, Albuquerque B, Leib C, Stanke M, Zimmermann H (2010) Knockdown of tissue nonspecific alkaline phosphatase impairs neural stem cell proliferation and differentiation. *Neurosci Lett* 485(3):208–211
25. Funakoshi H, Chan TO, Good JC, Libonati JR, Pihola J, Chen X, MacDonnell SM, Lee LL, Hermann DE, Zhang J, Martini J, Palmer TM, Sanbe A, Robbins J, Houser SR, Koch WJ, Feldman AM (2006) Regulated overexpression of the A1-adenosine receptor in mice results in adverse but reversible changes in cardiac morphology and function. *Circulation* 114(21):2240–2250
26. Zhao Z, Yaar R, Ladd D, Cataldo LM, Ravid K (2002) Overexpression of A3 adenosine receptors in smooth, cardiac, and skeletal muscle is lethal to embryos. *Microvasc Res* 63(1):61–69
27. Nureddin A, Epsaro E, Kiessling AA (1990) Purines inhibit the development of mouse embryos in vitro. *J Reprod Fertil* 90(2):455–464
28. Tsuchimori N, Miyashiro S, Shibai H, Ikegami S (1988) Adenosine induces dormancy in starfish blastulae. *Development* 103(2):345–351
29. Masse K, Bhamra S, Eason R, Dale N, Jones EA (2007) Purine-mediated signalling triggers eye development. *Nature* 449(7165):1058–1062
30. Masse K, Eason R, Bhamra S, Dale N, Jones EA (2006) Comparative genomic and expression analysis of the conserved NTPDase gene family in *Xenopus*. *Genomics* 87(3):366–381
31. Masse K, Bhamra S, Allsop G, Dale N, Jones EA (2010) Ectophosphodiesterase/nucleotide phosphohydrolase (Enpp) nucleotidases: cloning, conservation and developmental restriction. *Int J Dev Biol* 54(1):181–193
32. Bourdelas A, Li HY, Carron C, Shi DL (2009) Dynamic expression pattern of distinct genes in the presomitic and somitic mesoderm during *Xenopus* development. *Int J Dev Biol* 53(7):1075–1079
33. Iijima R, Kunieda T, Yamaguchi S, Kamigaki H, Fujii-Taira I, Sekimizu K, Kubo T, Natori S, Homma KJ (2008) The extracellular adenosine deaminase growth factor, ADGF/CECR1, plays a role in *Xenopus* embryogenesis via the adenosine/P1 receptor. *J Biol Chem* 283(4):2255–2264
34. Brown P, Dale N (2000) Adenosine A1 receptors modulate high voltage-activated Ca<sup>2+</sup> currents and motor pattern generation in the *xenopus* embryo. *J Physiol* 525(Pt 3):655–667
35. Bowes JB, Snyder KA, Segerdell E, Gibb R, Jarabek C, Noumen E, Pollet N, Vize PD (2008) Xenbase: a *Xenopus* biology and genomics resource. *Nucleic Acids Res* 36(Database issue):D761–D767
36. McGinnis S, Madden TL (2004) BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res* 32(Web Server issue):W20–W25
37. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22(22):4673–4680
38. Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M, Claverie JM, Gascuel O (2008) Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res* 36(Web Server issue):W465–W469
39. Nieuwkoop PD, Faber J (1994) Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing Inc, New York
40. Loret MO, Pedersen L, Francois J (2007) Revised procedures for yeast metabolites extraction: application to a glucose pulse to carbon-limited yeast cultures, which reveals a transient activation of the purine salvage pathway. *Yeast* 24(1):47–60
41. Hurlimann HC, Laloo B, Simon-Kayser B, Saint-Marc C, Culpier F, Lemoine S, Daigman-Fornier B, Pinson B (2011) Physiological and toxic effects of purine intermediate 5-amino-4-imidazolecarboxamide ribonucleotide (AICAR) in yeast. *J Biol Chem* 286(35):30994–31002

42. Hellsten U, Khokha MK, Grammer TC, Harland RM, Richardson P, Rokhsar DS (2007) Accelerated gene evolution and subfunctionalization in the pseudotetraploid frog *Xenopus laevis*. *BMC Biol* 5:31
43. Yanai I, Peshkin L, Jorgensen P, Kirschner MW (2011) Mapping gene expression in two *Xenopus* species: evolutionary constraints and developmental flexibility. *Dev Cell* 20(4):483–496
44. Baldwin SA, Beal PR, Yao SY, King AE, Cass CE, Young JD (2004) The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch* 447(5):735–743
45. Visser F, Zhang J, Raborn RT, Baldwin SA, Young JD, Cass CE (2005) Residue 33 of human equilibrative nucleoside transporter 2 is a functionally important component of both the dipyrindamole and nucleoside binding sites. *Mol Pharmacol* 67(4):1291–1298
46. Gray JH, Owen RP, Giacomini KM (2004) The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflugers Arch* 447(5):728–734
47. Ralevic V, Burnstock G (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50(3):413–492
48. Wilson DK, Rudolph FB, Quirocho FA (1991) Atomic structure of adenosine deaminase complexed with a transition-state analog: understanding catalysis and immunodeficiency mutations. *Science* 252(5010):1278–1284
49. Mohamedali KA, Kurz LC, Rudolph FB (1996) Site-directed mutagenesis of active site glutamate-217 in mouse adenosine deaminase. *Biochemistry* 35(5):1672–1680
50. Sideraki V, Mohamedali KA, Wilson DK, Chang Z, Kellems RE, Quirocho FA, Rudolph FB (1996) Probing the functional role of two conserved active site aspartates in mouse adenosine deaminase. *Biochemistry* 35(24):7862–7872
51. Schmitt SM, Gull M, Brandli AW (2014) Engineering *Xenopus* embryos for phenotypic drug discovery screening. *Adv Drug Deliv Rev* 69–70:225–246
52. Morin RD, Chang E, Petrescu A, Liao N, Griffith M, Chow W, Kirkpatrick R, Butterfield YS, Young AC, Stott J, Barber S, Babakaiff R, Dickson MC, Matsuo C, Wong D, Yang GS, Smailus DE, Wetherby KD, Kwong PN, Grimwood J, Brinkley CP 3rd, Brown-John M, Reddix-Dugue ND, Mayo M, Schmutz J, Beland J, Park M, Gibson S, Olson T, Bouffard GG, Tsai M, Featherstone R, Chand S, Siddiqui AS, Jang W, Lee E, Klein SL, Blakesley RW, Zeeberg BR, Narasimhan S, Weinstein JN, Pennacchio CP, Myers RM, Green ED, Wagner L, Gerhard DS, Marra MA, Jones SJ, Holt RA (2006) Sequencing and analysis of 10,967 full-length cDNA clones from *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis* reveals post-tetraploidization transcriptome remodeling. *Genome Res* 16(6):796–803
53. Narisawa S, Hoylaerts MF, Doctor KS, Fukuda MN, Alpers DH, Millan JL (2007) A novel phosphatase upregulated in Akp3 knockout mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293(5):G1068–G1077
54. Boison D (2013) Adenosine kinase: exploitation for therapeutic gain. *Pharmacol Rev* 65(3):906–943
55. Moriwaki Y, Yamamoto T, Higashino K (1999) Enzymes involved in purine metabolism—a review of histochemical localization and functional implications. *Histol Histopathol* 14(4):1321–1340
56. Diez-Roux G, Banfi S, Sultan M, Geffers L, Anand S, Rozado D, Magen A, Canidio E, Pagani M, Peluso I, Lin-Marq N, Koch M, Bilio M, Cantiello I, Verde R, De Masi C, Bianchi SA, Cicchini J, Perroud E, Mehmeti S, Dagand E, Schrinner S, Nurnberger A, Schmidt K, Metz K, Zwingmann C, Brieske N, Springer C, Hernandez AM, Herzog S, Grabbe F, Sieverding C, Fischer B, Schrader K, Brockmeyer M, Dettmer S, Helbig C, Alunni V, Battaini MA, Mura C, Henrichsen CN, Garcia-Lopez R, Echevarria D, Puelles E, Garcia-Calero E, Kruse S, Uhr M, Kauck C, Feng G, Milyaev N, Ong CK, Kumar L, Lam M, Semple CA, Gyenesi A, Mundlos S, Radelof U, Lehrach H, Sarmientos P, Raymond A, Davidson DR, Dolle P, Antonarakis SE, Yaspo ML, Martinez S, Baldock RA, Eichele G, Ballabio A (2011) A high-resolution anatomical atlas of the transcriptome in the mouse embryo. *PLoS Biol* 9(1):e1000582
57. Gonzales C, Ullrich ND, Gerber S, Berthonneche C, Niggli E, Pedrazzini T (2012) Isolation of cardiovascular precursor cells from the human fetal heart. *Tissue Eng Part A* 18(1–2):198–207
58. Robin E, Sabourin J, Marcillac F, Raddatz E (2013) Involvement of CD73, equilibrative nucleoside transporters and inosine in rhythm and conduction disturbances mediated by adenosine A1 and A2A receptors in the developing heart. *J Mol Cell Cardiol*
59. Woodland HR, Pestell RQ (1972) Determination of the nucleoside triphosphate contents of eggs and oocytes of *Xenopus laevis*. *Biochem J* 127(3):597–605
60. Adams A, Harkness RA (1976) Adenosine deaminase activity in thymus and other human tissues. *Clin Exp Immunol* 26(3):647–649
61. Linder N, Lundin J, Isola J, Lundin M, Raivio KO, Joensuu H (2005) Down-regulated xanthine oxidoreductase is a feature of aggressive breast cancer. *Clin Cancer Res* 11(12):4372–4381
62. Abbracchio MP, Burnstock G (1998) Purinergic signalling: pathophysiological roles. *Jpn J Pharmacol* 78(2):113–145
63. Burnstock G, Evans LC, Bailey MA (2014) Purinergic signalling in the kidney in health and disease. *Purinergic Signal* 10(1):71–101
64. Burnstock G, Vaughn B, Robson SC (2013) Purinergic signalling in the liver in health and disease. *Purinergic Signal*
65. Castrop H, Huang Y, Hashimoto S, Mizel D, Hansen P, Theilig F, Bachmann S, Deng C, Briggs J, Schnermann J (2004) Impairment of tubuloglomerular feedback regulation of GFR in ecto-5'-nucleotidase/CD73-deficient mice. *J Clin Invest* 114(5):634–642
66. Huang DY, Vallon V, Zimmermann H, Koszalka P, Schrader J, Osswald H (2006) Ecto-5'-nucleotidase (cd73)-dependent and -independent generation of adenosine participates in the mediation of tubuloglomerular feedback in vivo. *Am J Physiol Renal Physiol* 291(2):F282–F288
67. Street SE, Kramer NJ, Walsh PL, Taylor-Blake B, Yadav MC, King IF, Vihko P, Wightman RM, Millan JL, Zylka MJ (2013) Tissue-nonspecific alkaline phosphatase acts redundantly with PAP and NT5E to generate adenosine in the dorsal spinal cord. *J Neurosci* 33(27):11314–11322
68. Riegelhaupt PM, Cassera MB, Frohlich RF, Hazleton KZ, Hefter JJ, Schramm VL, Akabas MH (2010) Transport of purines and purine salvage pathway inhibitors by the *Plasmodium falciparum* equilibrative nucleoside transporter PfENT1. *Mol Biochem Parasitol* 169(1):40–49
69. Masse K, Dale N (2012) Purines as potential morphogens during embryonic development. *Purinergic Signal* 8(3):503–521

## Supplementary figure

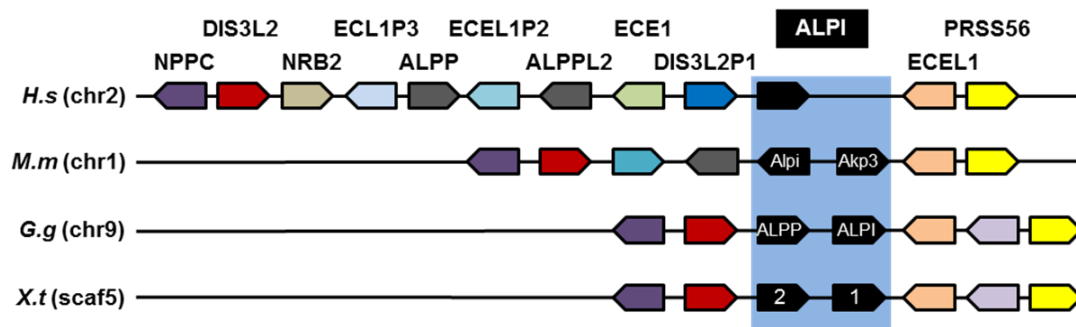


Fig S1. Synteny conservation of the *intestinal alkaline phosphatase (ALPI)* family genes in vertebrate genomes. The map was generated by comparison of *X.tropicalis*, *G.gallus*, *M.musculus* and *H.sapiens* chromosome regions containing *ALPI* genes. The NCBI GenID of *ALPI* genes are given in Table S2 and as follows: ALPI-G.g: 424936; ALPP-G.g: 100859876; ALPI-M.m: 76768; AKP3-M.m: 11648; ALPI-H.s: 248. Each conserved gene is color coded. The orientation of the genes on the different chromosome (chr) or scaffold (scaf) is indicated. G.g, *Gallus gallus*; H.s, *Homo sapiens*; M.m, *Mus musculus*; X.t, *Xenopus tropicalis*.

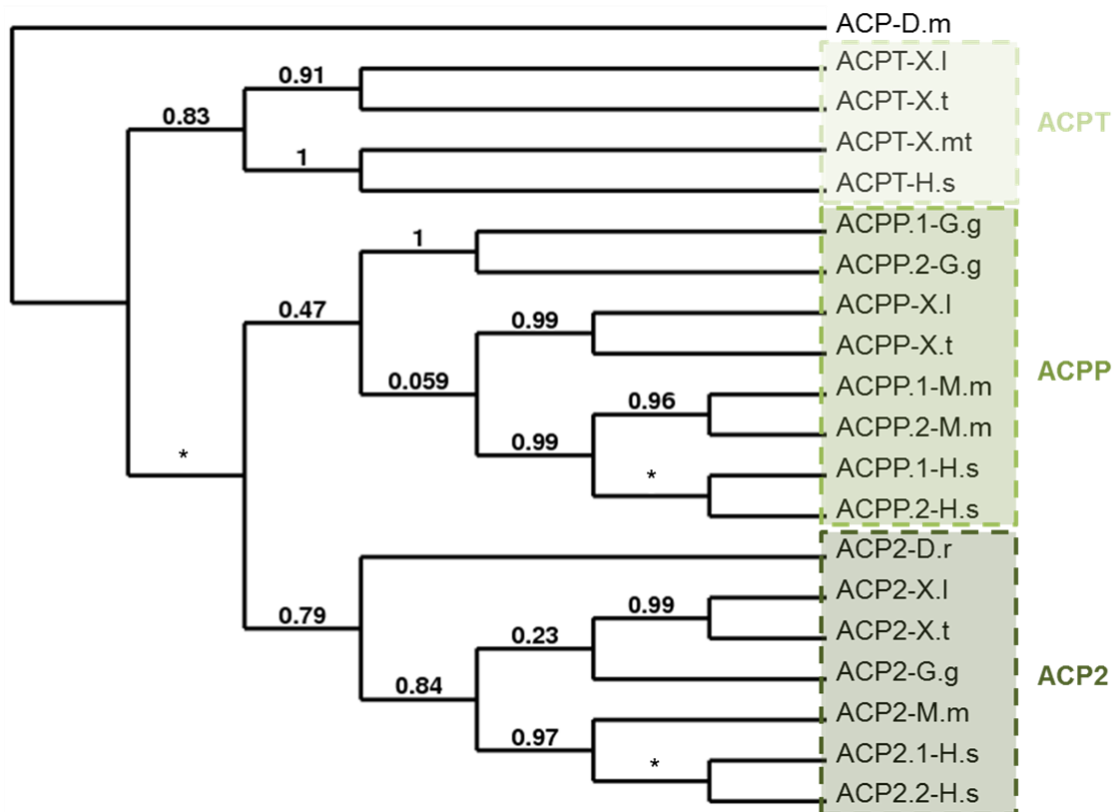


Fig S2. Relatedness of the acid phosphatase (ACP) proteins. A phylogenetic tree of vertebrate acid phosphatases was constructed on the Phylogeny.fr platform. A cluster algorithm was used to build the tree. Likelihood ratio is indicated at each node of the tree. The star represents a trifurcation (likelihood ratio null). The GenBank accession numbers of ACP proteins are given in Table S2 and as follows: ACP-D.m: NP\_649118; ACP2-D.r: NP\_001013355; ACP2-G.g: NP\_001026719; ACP2-M.m: NP\_031413; ACP2-H.s: NP\_001601; ACPT-M.m: NP\_001181963; ACPT-H.s: NP\_149059; ACP2.1-G.g: XP\_001235914; ACP2.2-G.g: XP\_004939503; ACP2.1-M.m: NP\_997551; ACP2.2-M.m: NP\_062781; ACP2.1-H.s: NP\_001127666; ACP2.2-H.s: NP\_001090. ACP2, Lysosomal Acid Phosphatase; ACP2, Prostatic Acid Phosphatase; ACPT, Testicular Acid Phosphatase. D.m, *Drosophila melanogaster*; D.r, *Danio rerio*; G.g, *Gallus gallus*; H.s, *Homo sapiens*; M.m, *Mus musculus*; X.l, *Xenopus laevis*; X.t, *Xenopus tropicalis*.

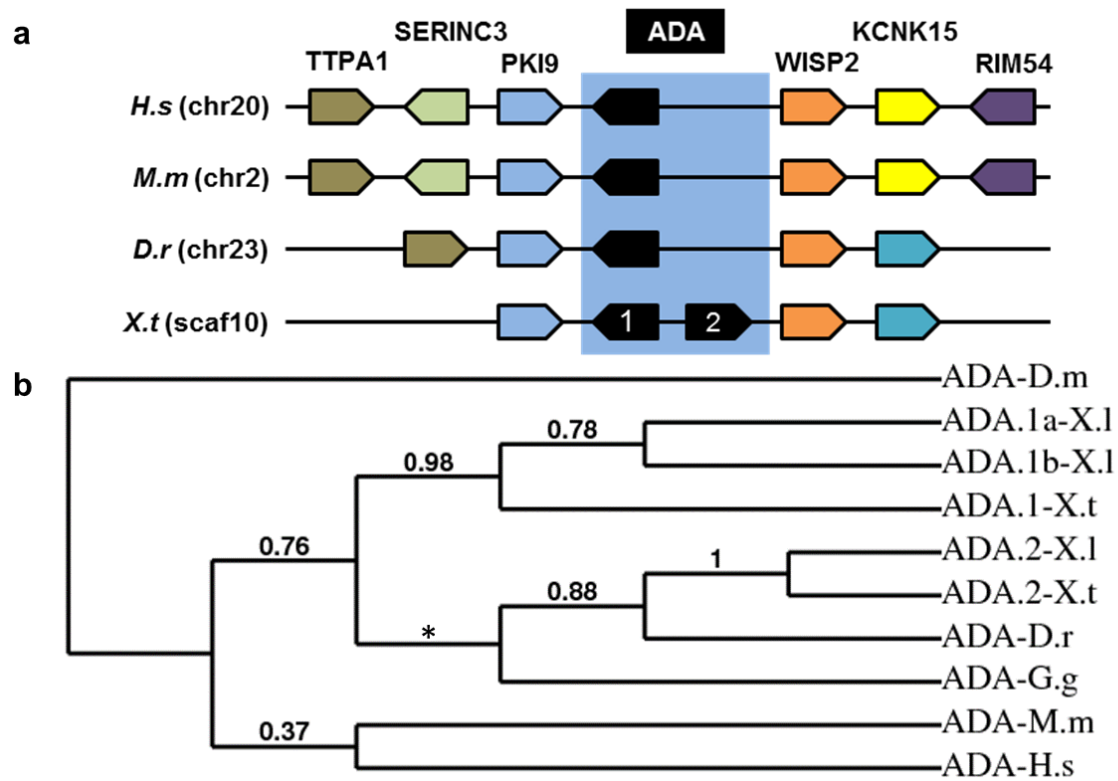


Fig S3. **Conservative evolution of the adenosine deaminase (ADA) genes.** a. Phylogenetic tree of vertebrate ADA proteins. A phylogenetic tree was constructed on the Phylogeny.fr platform. A cluster algorithm was used to build the tree. Likelihood ratio is indicated at each node of the tree. The star represents a trifurcation (likelihood ratio null). The GenBank accession numbers of ADA proteins are given in Table S2 and as follows: ADA-D.m: NP\_649866; ADA-D.r: NP\_001002646; ADA-G.g: NP\_001006290; ADA-M.m: NP\_031424; ADA-H.s: NP\_000013. b. Synteny map for the ADA genes in vertebrate genomes. The map was generated by comparison of *X.tropicalis*, *G.gallus*, *M.musculus* and *H.sapiens* chromosome regions containing ADA genes. The NCBI GeneID are given in Table S2 and as follows: G.g: 419194; M.m: 11486; H.s: 100. Each conserved gene is color coded. The orientation of the genes on the different chromosome (chr) or scaffold (scaf) is indicated. D.m, *Drosophila melanogaster*; D.r, *Danio rerio*; G.g: *Gallus gallus*; H.s, *Homo sapiens*; M.m, *Mus musculus*; X.l, *Xenopus laevis*; X.t, *Xenopus tropicalis*.



a

```

pnp.a-X.l  -----EK SCTYEYKQTS WLLS TKRPIVAI CGSGLGGL E IKDQC F YC IPNFKSTVPGHAGRLIFG L
pnp.b-X.l  PPAPASQRQK SCTYEDYKDTA WLLS TKRPIVAI CGSGLGGL E ITDQC F YC IPNFPQSTVPGHAGRLIFG L
pnp-X.t    PPAPAGQKQEE RHTEYDYKQTA WLLS TKRPTVAI CGSGLGGL N LIEPD F YS IPNFPQSTVPGHAGRLIFG L
PNP-H.s    -----MENGTYEDYKNTAEWLLSHTKRPOVAIICGSGLGGLTDKLTQAQTFDYGEIPNFFRSTVPGHAGRLIFGFL

pnp.a-X.l  G CV MQGRFH YEGYPLWKVTFPVRVHLLGV A LTNAAGGLN FSVGDIM I DHIN VGF GQNPL G NEDRFG
pnp.b-X.l  G CV MQGRFH YEGYPLWKVTFPVRVRLGV V VTNAAGGLN FNVGDIM I DHIN LGF GQNPL G NEDRFG
pnp-X.t    G CV MQGRFH YEGYPLWKVTFPVRVRLGV V VTNAAGGLN FSVGDIM I DHIN LGF GQNPL G NEDRFG
PNP-H.s    NGRACVMMQGRFHYEGYPLWKVTFPVRVHLLGVDTLVVTNAAGGLNPKFVFGDIMLIRDHINLPFGSGQNPLRGENDERFGD

pnp.a-X.l  RFP MSDAYN NMR L A G Y MREG Y L GP FET AECRFLNKLGADAVGMSTV EV VARHCGLRI G SLI
pnp.b-X.l  RFP MSDAYD DMR L A G Y IKEG Y I GP FET GECRFLNKLGADAVGMSTV EV VARHCGLRI G SLI
pnp-X.t    RFP MSDAYD EMR L T G F MREG Y I GP FET AECRYLSKIGADAVGMSTV EV VARHCGLRS G SLI
PNP-H.s    RFPMSDAYDRTMRQALSTWKQMGEQRELQEGTYVMVAGPSFETVAECRVLOKLGADAVGMSTVEVIVARHCGLRVFGSLI

pnp.a-X.l  TNK MDY SNF ANHEEVL AGK A E VS DL K 288
pnp.b-X.l  TNK MDY SKV ANHEEVL AGR A E VS DL K 296
pnp-X.t    TNK MDY SKA ANHEEVL AGR A E VS NL Q 297
PNP-H.s    TNKVTIMDYESLEKANHEEVLAAAGKQAAQKLEQFVSILMASIPDPKAS 289

```

b

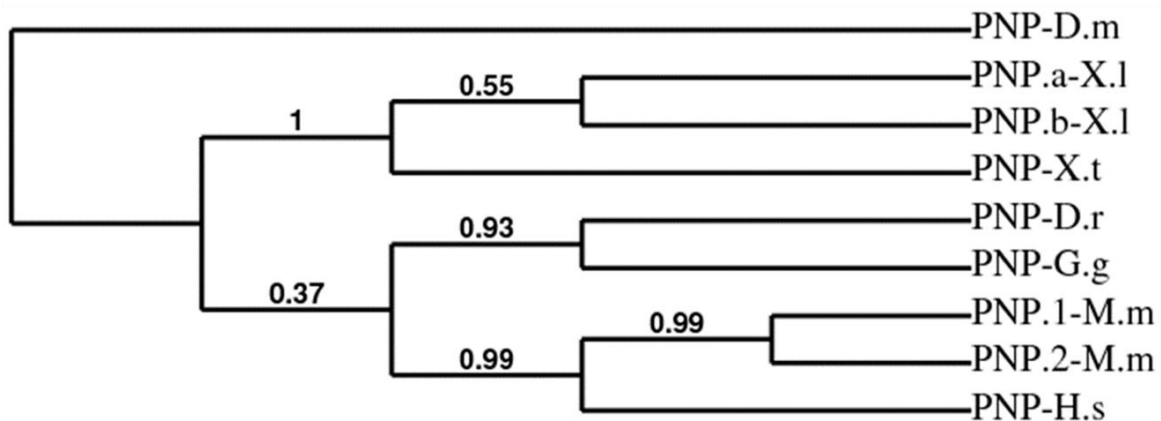
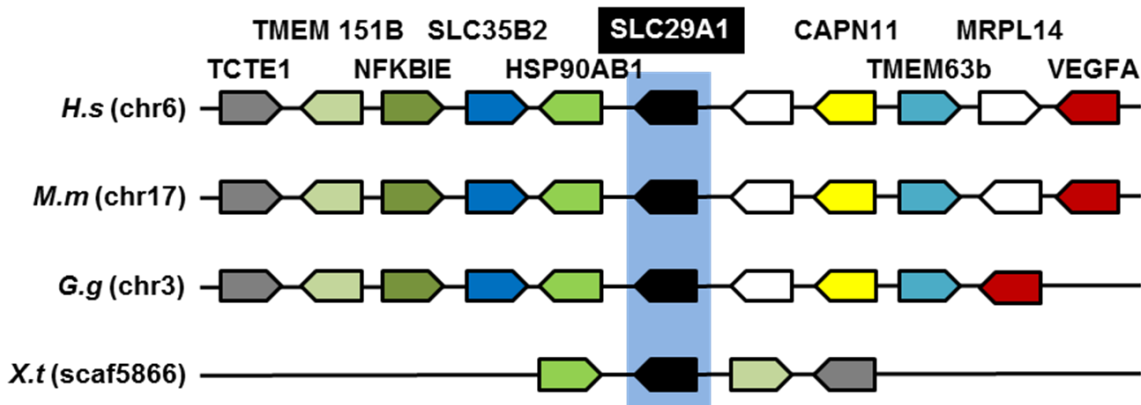
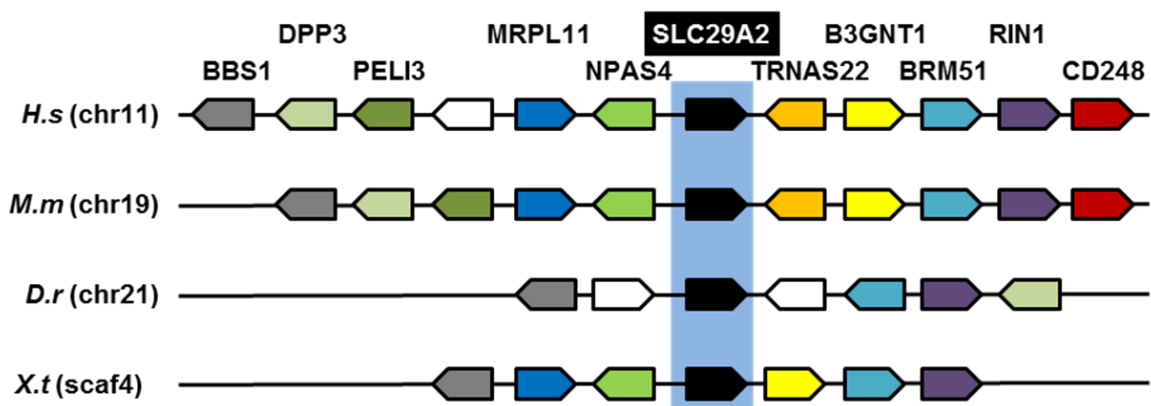


Fig S4. **Conservative evolution of purine nucleoside phosphorylase (PNP) genes.** a. Alignment of *Xenopus* and human PNP coding sequences. The four coding sequences for *X.laevis*, *X.tropicalis* and *H.sapiens* PNP proteins were aligned using CLUSTAL W2 software on the EMBL-EBI Website. Residues conserved in all sequences are indicated by a black background. Residues conserved only in the *Xenopus* sequences are indicated by a green background. Residues conserved only in *X.laevis* sequences are indicated with a blue background. Residues conserved between either *X.laevis* *pnp.a* or *pnp.b* and at least one of the two orthologues are indicated by a yellow or gray background respectively. The specific *X.laevis* residues are indicated in bold. Spaces in the sequences are indicated by a dash. The GenBank accession numbers of PNP proteins are given in Table S2 and as follows: PNP-D.m: NP\_647727 (isoform B); PNP-D.r: NP\_991218; PNP-G.g: XP\_003641950; PNP.1-M.m: NP\_038660; PNP.2-M.m: NP\_001116843; PNP-H.s: NP\_000261. b. Phylogenetic tree of vertebrate PNP proteins. A phylogenetic tree was constructed on Phylogeny.fr platform. A cluster algorithm was used to build the tree. Likelihood ratio is indicated at each node of the tree. D.m, *Drosophila melanogaster*; D.r, *Danio rerio*; G.g, *Gallus gallus*; H.s, *Homo sapiens*; M.m, *Mus musculus*; X.l, *Xenopus laevis*; X.t, *Xenopus tropicalis*.

a



b



c

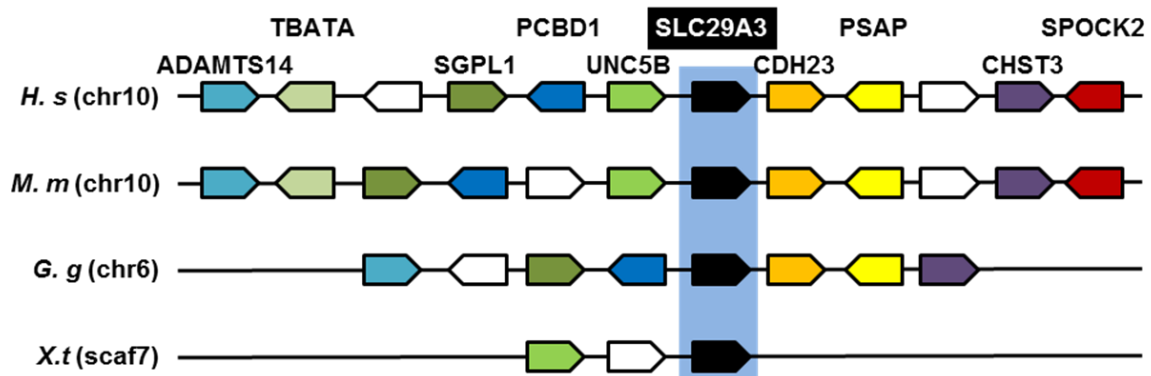
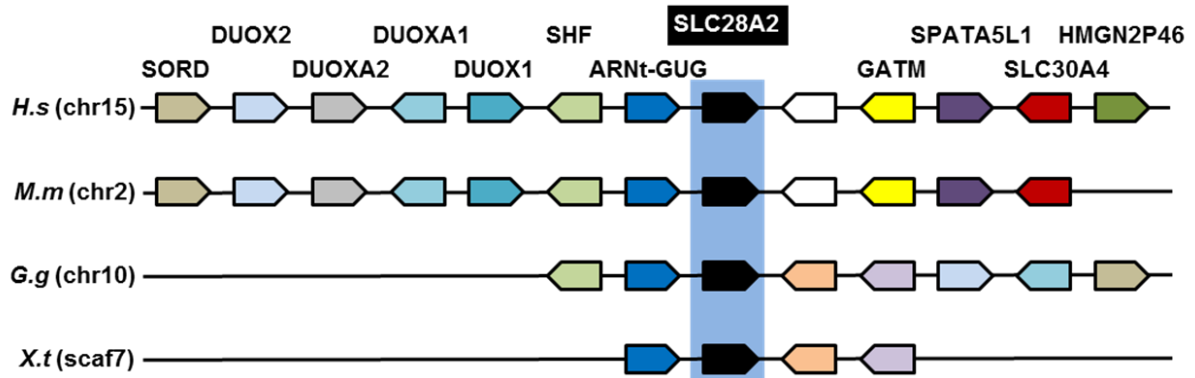


Fig S5. **Conservative evolution of the equilibrative nucleoside transporter (*SLC29A*) genes.** The synteny map for the *slc29a* genes was generated by comparison of *X.tropicalis*, *G.gallus* or *Danio rerio*, *M.musculus* and *H.sapiens* chromosome regions containing *SLC29A1*(a), *SLC29A2* (b) and *SLC29A3* (c) genes. The NCBI GeneID of *SLC29A* genes are given in Table S2 and as follows: *SLC29A1*: G.g: 421439; M.m: 63959; H.s: 2030; *SLC29A2*: D.r: 503537; M.m: 13340; H.s: 3177; *SLC29A3*: G.g: 423717; M.m: 71279; H.s: 55315. Each conserved gene is color coded; the unconserved genes are indicated by white boxes. The orientation of the genes on the different chromosome (chr) or scaffold (scaf) is indicated. D.r, *Danio rerio*; G.g: *Gallus gallus*; H.s, *Homo sapiens*; M.m, *Mus musculus*; X.l, *Xenopus laevis*; X.t, *Xenopus tropicalis*.

a



b

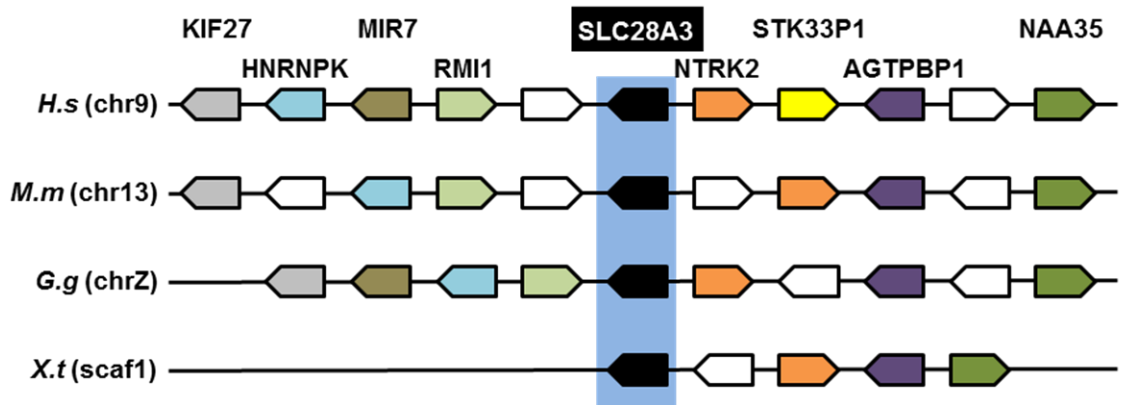


Fig S6. **Conservative evolution of the concentrative nucleoside transporter (*SLC28A*) genes.** The synteny map for the *slc28a* genes was generated by comparison of *X.tropicalis*, *G.gallus*, *M.musculus* and *H.sapiens* chromosome regions containing *SLC28A2* (a) and *SLC28A3* (b) genes. The NCBI GenID of *SLC28A* genes are given in Table S2 and as follows: *SLC28A2*: G.g: 415338; M.m: 269346; H.s: 9153; *SLC28A3*: G.g: 427459; M.m: 114304; H.s: 64078. Each conserved gene is color coded; the unconserved genes are indicated by white boxes. The orientation of the genes on the different chromosome (chr) or scaffold (scaf) is also indicated. G.g: *Gallus gallus*; H.s, *Homo sapiens*; M.m, *Mus musculus*; X.l, *Xenopus laevis*; X.t, *Xenopus tropicalis*.

Name		<i>X.laevis</i>				<i>X.tropicalis</i>		
Gene	Protein	Homeologue	GeneID	DNA	Protein	Gene ID	DNA	Protein
<i>nt5e</i>	<i>cd73</i>	N.d.	734513	NM_001095994	NP_001089463	100489347	XM_002933927	XP_002933973
<i>alpl</i>	<i>tnap</i>	N.d.	380589	NM_001087426	NP_001080895	100485467	XM_002943439	XP_002943485
<i>alpi.1</i>	<i>iap.1</i>	N.d.	100036885	NM_001097666	NP_001091135	548375	XM_002937341	XP_002937387
<i>alpi.2</i>	<i>iap.2</i>	N.d.	100127270	NM_001112847	NP_001106318	100144722	NM_001123474	NP_001116946
<i>acpt</i>	<i>tacp</i>	N.d.	446918	NM_001093611	NP_001087080	100494856	XM_002934647	XP_002934693
<i>acpp</i>	<i>pacp</i>	N.d.	N.d.	This work	This work	101735257	XM_004915370	XP_004915427
<i>adora1</i>	<i>a1</i>	<i>a</i>	378623	NM_001085844	NP_001079313	100127730	NM_001113069	NP_001106540
		<i>b</i>	N.d.	This work	This work			
		<i>a</i>	495175	NM_001094867	NP_001088336			
<i>adora2a</i>	<i>a2a</i>	<i>b</i>	N.d.	This work	This work	100127551	XM_002938923	NP_001106398
		<i>a</i>	N.d.	This work	This work			
<i>adora2b</i>	<i>a2b</i>	<i>b</i>	N.d.	This work	This work	100496230	XM_002938923	XP_002938969
		<i>a</i>	N.d.	This work	This work			
<i>adora3.1</i>	<i>a3.1</i>	N.d.	N.d.	This work	This work	100496142	XM_002932802	XP_002932848
<i>adora3.2</i>	<i>a3.2</i>	N.d.	N.d.	This work	This work	100496301	XM_002932803	XP_002932849
<i>adora3.3</i>	<i>a3.3</i>	N.d.	N.d.	This work	This work	101734629	XM_004910728	XP_004910785
<i>adk</i>	<i>adk</i>	N.d.	444786	NM_001092888	NP_001086357	549452	NM_001016698	NP_001016698
<i>ada.1</i>	<i>ada.1</i>	<i>a</i>	444167	NM_001092271	NP_001085740	496434	NM_001011025	NP_001011025
		<i>b</i>	N.d.	This work	This work			
<i>ada.2</i>	<i>ada.2</i>	N.d.	447564	NM_001094271	NP_001087740	100135194	NM_001113897	NP_001107369
<i>pnp</i>	<i>pnp</i>	<i>a</i>	379499	NM_001086340	NP_001079809	448370	NM_001006719	NP_001006720
		<i>b</i>	N.d.	BC047264	This work			
<i>slc29a1</i>	<i>ent1</i>	<i>a</i>	496024	NM_001095291	NP_001088760	548435	NM_001015718	NP_001015718
		<i>b</i>	398868	NM_001089858	NP_001083327			
<i>slc29a2</i>	<i>ent2</i>	N.d.	444417	NM_001092519	NP_001085988	548864	NM_001016110	NP_001016110
<i>slc29a3</i>	<i>ent3</i>	<i>a</i>	445860	BC077451	AAH77451	100037858	NM_001097303	NP_001090772
		<i>b</i>	N.d.	This work	This work			
<i>slc28a2</i>	<i>cnt2</i>	N.d.	446617	NM_001093313	NP_001086782	100496776	XM_002934569	XP_002934615
<i>slc28a3</i>	<i>cnt3</i>	N.d.	N.d.	This work	This work	100492606	XM_002934977	XP_002935023

N.d.: not determined

Table S1. **Accession numbers of the different clones used in the study.** The adenosine production enzymes are indicated in green, adenosine receptors in blue, adenosine degradation enzymes in orange (for intracellular degradation) and red (for extracellular degradation) and nucleosides transporters in grey.

	Primers (5'-3')	cDNA size (bp)	Genomic DNA size (bp)	Cycle s	Anneling temperature (°C)	References
<i>cd73</i>	U-GGCGTGAAGCTGCTTAT D-CAGTGCCAACTGTAGT	212	22 034	31	55	This work
<i>alpl</i>	U-TTGCCCACTAGCCCAAGCCC D-GAGGGTCCCCAGCAGGAGCA	169	10 750	29	61	This work
<i>alpi.1</i>	U-TCTCCTCCGCAACACATGT D-GGTCAGTTCTGTTGAACC	435	4 304	27	61	This work
<i>alpi.2</i>	U-CTATCCTCTCCCGATGT D-CTGGATTTCCTCTGCATC	523	1 843	31	56	This work
<i>acpt</i>	U-ACAGCACCCCTCATAGCGTTA D-AGACAGAACAGCATCACGGT	354	1 828	31	61	This work
<i>adora1</i>	U-GCCTTGGTCATCCCACTCGCC D-GGACAGCACCCCAACATCCCGT	228 (a) / 232 (b)	24 478 (a) / 26 527 (b)	30	59	This work
<i>adora2a</i>	U-ATTGCAATTAGTACCGGATTTGT D-TTCTCCACATGTCACCTTTCATTTT	456 (a) / 453 (b)	4 970 (a) / 4 422 (b)	32	59	This work
<i>adora2b</i>	U-GGCCGTGGCCATTGACAGGTA D-AGCTGCTTACGGGCAACCATGA	327 (a) / ? (b)	48 274 (a) / >38 546 (b)	30	61	This work
<i>adora 3.1</i>	U-GGGTAATGAGACAGCCGAA D-CCTGCAGAAGATCCTGGTTG	355	5 829	33	60	This work
<i>adora3.3</i>	U-GATGAAGATTTTCTATCTACA D-CTCCTCACGTTTTTTGAATT	321	11 427	34	55	This work
<i>adk</i>	U-CGGGGTCTTCTCCTCACAGTC D-ACGTAGCAGCTTCCGTTTCA	186	15 826	24	63	This work
<i>ada.1</i>	U-CAAACCTCCCCGACAGACCGGT D-GTGCCCGGGGTACGACTCAC	481 (a) / 481 (b)	6438 (a) / 8546 (b)	30	61	This work
<i>ada.2</i>	U-GTTGAGACGGAAGCCAAACAAG D-TCTTTGACCACTGAAGGTGGCC	416	> 3000	31	61	This work
<i>pnp</i>	U-TAGCTGCTGGCAAGGAGCTGGGT D-TGTTGCCAACCGCAGCTGTTCT	503 (a) / 510 (b)	1574 (a) / 2576 (b)	28	61	This work
<i>pnp.b</i>	U-TTCTGGGAGCTGTAGCCCGTCA D-GCTGGCGTCAATGGACACAAAA	510	510	30	61	This work
<i>slc29a1.a</i>	U-AATGCCCCGACAGACCGGTACAA D-AGGTAAGTCCGAGGTGCTACCA	250	3817	28	61	This work
<i>slc29a2</i>	U-CAAGTACCGCTTGGTCGCTGTT D-TAGGTCTGAGGAAGGAGAGTCAG	485	4555	29	61	This work
<i>slc29a3</i>	U-GGGCTTCATTGCCCTGGAACCTT D-GACATGGCACCGATGGAACAGC	164 (a) / 168 (b)	2988 (a) / 1975 (b)	28	61	This work
<i>slc28a2</i>	U-CTATCCTGAGGTGGAAGAATCA D-ATTCCGATAATTGCCTGTAGGC	362	1434	30	61	This work
<i>slc28a3</i>	U-GCTAGCAGCAAGGTCTTAAG D-GCCTTCATATCTGTCCATGA	333	8043	29	61	This work
<i>odc</i>	U-GGAGCTGCAATTTGGAGA D-TCAGTTGCCAGTGTGGTC	131	220	20	55	Bassez <i>et al.</i> , 1990
<i>ef1a</i>	U-CAGATTGGTGCTGGATATGC D-CACTGCCTTGATGACTCCTA	270	N. d.	20	55	Mohun <i>et al.</i> , 1989

N.d.: not determined

Table S2. **Primers sequences and PCR conditions for required markers.** The adenosine production enzymes are indicated in green, adenosine receptors in blue, adenosine degradation enzymes in orange (for intracellular degradation) and red (for extracellular degradation) and nucleosides transporters in grey.

Gene	<i>X.laevis</i>	<i>X.tropicalis</i>
<i>cd73</i>	Xenbase query (FL clone)	Xenbase query (FL clone)
<i>alpi</i>	Xenbase query (FL clone)	Xenbase query (FL clone)
<i>alpi.1</i>	Xenbase query (FL clone)	Xenbase query (FL clone)
<i>alpi.2</i>	Xenbase query (FL clone)	Xenbase query (FL clone)
<i>acpt</i>	Xenbase query (FL clone)	Xenbase query (FL clone)
<i>acp2</i>	Xenbase query (FL clone)	Xenbase query (FL clone)
<i>acpp</i>	BLAST search (genomic sequence)	Xenbase query (FL clone)
<i>adora 1.a</i>	Xenbase query (FL clone)	Xenbase query (FL clone)
<i>adora 1.b</i>	BLAST search (genomic sequence)	BLAST search (genomic sequence) Not found
<i>adora 2a.a</i>	Xenbase query (FL clone)	Xenbase query (FL clone)
<i>adora 2a.b</i>	BLAST search (genomic sequence)	BLAST search (genomic sequence) Not found
<i>adora 2b.a</i>	BLAST search (genomic sequence)	Xenbase query (FL clone)
<i>adora 2b.b</i>	BLAST search (genomic sequence)	BLAST search (genomic sequence) Not found
<i>adora 3.1</i>	BLAST search (genomic sequence)	Xenbase query (FL clone)
<i>adora 3.2</i>	BLAST search (genomic sequence)	Xenbase query (FL clone)
<i>adora 3.3</i>	BLAST search (genomic sequence)	Xenbase query (FL clone)
<i>adk</i>	Xenbase query (FL clone)	Xenbase query (FL clone)
<i>ada.1a</i>	Xenbase query (FL clone)	Xenbase query (FL clone)
<i>ada.1b</i>	BLAST search (genomic sequence)	BLAST search (genomic sequence) Not found
<i>ada.2</i>	Xenbase query (FL clone)	Xenbase query (FL clone)
<i>pnp.a</i>	BLAST search (genomic sequence)	Xenbase query (FL clone)
<i>pnp.b</i>	Xenbase query (FL clone)	BLAST search (genomic sequence) Not found
<i>slc29a1.a</i>	Xenbase query (FL clone)	Xenbase query (FL clone)
<i>slc29a1.b</i>	Xenbase query (FL clone)	BLAST search (genomic sequence) Not found
<i>slc29a2</i>	Xenbase query (FL clone)	Xenbase query (FL clone)
<i>slc29a3.a</i>	Xenbase query (FL clone)	Xenbase query (FL clone)
<i>slc29a3.b</i>	BLAST search (genomic sequence)	BLAST search (genomic sequence) Not found
<i>slc28a2</i>	Xenbase query (FL clone)	Xenbase query (FL clone)
<i>slc28a3</i>	BLAST search (genomic sequence)	Xenbase query (FL clone)

FL: Full Length

Table S3. Cloning strategy used to identify *Xenopus* adenosine pathway genes. The adenosine production enzymes are indicated in green, adenosine receptors in blue, adenosine degradation enzymes in orange (for intracellular degradation) and red (for extracellular degradation) and nucleosides transporters in grey.



		ACPT			ACPP				ACP2			
		X.l	X.t	H.s	X.l	X.t	.1 H.s	.2 H.s	X.l	X.t	.1 H.s	.2 H.s
ACPT	X.l	100										
	X.t	88.3	100									
	H.s	45.2	46.1	100								
ACPP	X.l	41.1	42.8	36.1	100							
	X.t	39.6	40.8	36.8	81.0	100						
	.1 H.s	42.1	41.4	39.0	51.0	48.1	100					
	.2 H.s	44.6	44.0	41.2	49.5	49.7	98.2	100				
ACP2	X.l	44.5	44.7	39.2	42.8	43.2	46.2	49.5	100			
	X.t	41.7	41.6	40.1	41.8	41.5	45.5	48.5	76.6	100		
	.1 H.s	43.8	45.1	41.4	46.3	45.1	45.5	47.4	58.6	58.9	100	
	.2 H.s	46.9	47.5	46.9	51.3	48.8	49.4	49.4	56.9	58.8	93.8	100

Table S4. **Identity conservation between *Xenopus* acp proteins and their human orthologs.** The percentage of amino acid identity between proteins was determined by pairwise alignment using Clustal W2 software on the EMBL-EBI Internet site. The accession numbers of the different proteins are given in Table S2 and in the legend of Fig S2. H.s, *Homo sapiens*; X.l, *Xenopus laevis*; X.t, *Xenopus tropicalis*.

		X.l			X.t		H.s
		ADA.1a	ADA.1b	ADA.2	ADA.1	ADA.2	
X.l	ADA.1a	100					
	ADA.1b	94.4	100				
	ADA.2	66.2	65.4	100			
X.t	ADA.1	95.8	94.1	67.9	100		
	ADA.2	67.7	68.0	91.0	68.3	100	
H.s		69.0	68.0	57.8	70.4	59.3	100

Table S5. **Identity conservation between *Xenopus* ada proteins and their human orthologs.** The percentage of amino acid identity between proteins was determined by pairwise alignment using Clustal W software on the EMBL-EBI Internet site. The accession numbers of the different proteins are given in Table S2 and in the legend of Fig S3. H.s, *Homo sapiens*; X.l, *Xenopus laevis*; X.t, *Xenopus tropicalis*.

	PNP.a X.l	PNP.b X.l	PNP X.t	PNP H.s
PNP.a X.l	100			
PNP.b X.l	89.9	100		
PNP X.t	86.8	89.9	100	
PNP H.s	65.5	63.3	64.7	100

Table S6. **Identity conservation between *Xenopus* pnp proteins and their human orthologues.** The percentage of amino acid identity between the *Xenopus* and human proteins was determined by pairwise alignment using Clustal W2 software on the EMBL-EBI Website. The accession numbers of the different proteins are given in Table S2 and in the legend of Fig S4. H.s, *Homo sapiens*; X.l, *Xenopus laevis*; X.t, *Xenopus tropicalis*.

	X.l					X.t			H.s				
	SLC29A1.a	SLC29A1.b	SLC29A2	SLC29A3.a	SLC29A3.b	SLC29A1	SLC29A2	SLC29A3	SLC29A1	SLC29A2	SLC29A3a	SLC29A3b	SLC29A4
X.l	100												
	91.8	100											
	45.5	44.4	100										
	32.0	33.3	31.0	100									
	31.2	32.2	30.3	89.7	100								
X.t	88.4	90.2	46.6	33.6	32.8	100							
	47.8	47.5	89.3	32.1	31.0	47.9	100						
	24.5	24.5	27.9	85.1	83.6	25.0	26.4	100					
	61.2	61.4	44.9	34.9	34.4	61.1	46.9	29.3	100				
	47.8	47.9	59.2	32.7	32.2	48.6	60.1	29.3	46.7	100			
H.s	29.9	30.5	25.5	52.4	51.4	30.4	26.2	22.2	30.2	29.1	100		
	13.7	14.4	14.4	25.5	28.1	13.9	14.9	33.5	14.1	15.9	54.3	100	
	21.4	21.3	21.2	20.5	19.2	22.9	22.9	15.4	21.1	23.3	23.1	11.9	100

Table S7. **Identity conservation between *Xenopus* slc29a proteins and their human orthologs.** The percentage of amino acid identity between proteins was determined by pairwise alignment using Clustal W2 software on the EMBL-EBI Internet site. The GenBank accession numbers of transporter proteins are given in Table S2 and in the legend of Fig 3. H.s, *Homo sapiens*; X.l, *Xenopus laevis*; X.t, *Xenopus tropicalis*.





		X.l		X.t		H.s		
		SLC28A2	SLC28A3	SLC28A2	SLC28A3	SLC28A1	SLC28A2	SLC28A3
X.l	SLC28A2	100						
	SLC28A3	45.0	100					
X.t	SLC28A2	90.9	45.4	100				
	SLC28A3	48.7	91.1	49.8	100			
H.s	SLC28A1	58.0	40.5	56.1	42.7	100		
	SLC28A2	56.6	41.0	56.1	43.0	63.0	100	
	SLC28A3	46.4	62.0	44.8	63.4	42.1	40.9	100

Table S8. **Identity conservation between *Xenopus slc28a* proteins and their human orthologs.** The percentage of amino acid identity between proteins was determined by pairwise alignment using Clustal W2 software on the EMBL-EBI Internet site. The GenBank accession numbers of transporter proteins are given in Table S2 and the legend of Fig 3. H.s, *Homo sapiens*; X.l, *Xenopus laevis*; X.t, *Xenopus tropicalis*

	Primer (séquence homéologue a)	Taille amplifié a (pb)	Séquence homéologue b potentiellement reconnue (nombre de nucléotide additionnel)	Nombre de nucléotide différent (additionnel)/nombre nucléotide total du primer	Taille amplifié b potentiel (pb)	Hybridation
Adora1	F GCCTTGGTCATCCCACTCGCC	228	GCCTTGGTCATCCCACTCGCC	0/21	232	a et b
	R GGACAGCACCCAACATCCCGT		GGAGAGGACCCAACATCCCGT	3/21		
Adora2a	F ATTGCAATTAGTACCGATTITGT	456	ATTGCAATTAGTACCGATTITGT	1/24	453	a et b
	R TTCTCCACATGTCACTTTCATTTT		TTCTTCACATGTCACTTTCATTTT	2/21		
Adora2b	F GGCCGTGGCCATTGACAGGTA	327	?	?	?	a et ?
	R AGCTGCTTACGGGCAACCATGA		AGCTGCTTACGGGCAACCATGA	1/22		
Ada.1	F CAAACTCCCGCAGACACGGT	481	CAAGTCTCCCGCAGACACAGT	2/21	481	a et b
	R GTGCCCGGGTACGACTCAC		GTGCCCGGGTACGACTCAC	0/20		
Pnp	F TAGCTGCTGGCAAGGAGCTGGGT	503	TGGCCGCTGGCAAGGAGCTGGGT	2/23	510	a et b
	R TCCTGCCAACCAGCTGTTCT		TCCTGCCAACCAGCTGTTCT	2/23		
Slc29a1	F AATGCCCGACAGACCGGTACAA	250	AAACCCCGACAGACAGGTACAA	3/23	211	a
	R AGGTAAGTCCGAGGTGCTACCA		AGGTAAGTCCGAGGTG(5)CCATCA	4+(5)/22		
Slc29a3	F GGGCTTCATTGCCCTGGAACCT	164	GGGCTTCATTGCCCTGGAACCT	0/22	168	a et b
	R GACATGGCACCGATGGAACAGC		GGCATGGCACATGATGGAACAGC	2/22		

Tableau 3: Différences entre les séquences nucléotidiques reconnues par les primers spécifiques des récepteurs *adora 1, 2a et 2b, ada, pnp, slc29a1* et *slc28a3*. Les nucléotides différents entre le primer et la séquence nucléotidique du gène homéologue b sont colorés en rouge et leur nombre est reporté dans la colonne de gauche.

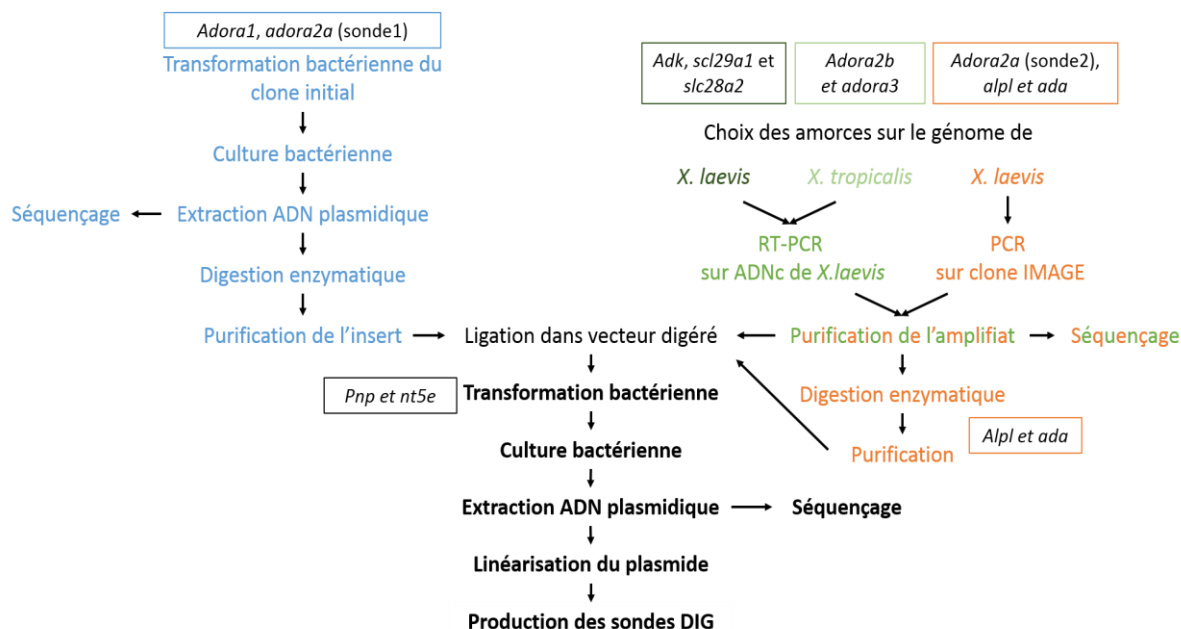


Figure 63: Stratégie générale utilisée pour le clonage moléculaire des gènes étudiés. Les gènes sont encadrés de la couleur associée à la stratégie utilisée pour son clonage. La partie en bleue correspond au sous-clonage enzymatique à partir d'un plasmide. La partie en vert et orange correspond au sous-clonage à partir d'une PCR ou RT-PCR. Plusieurs stratégies ont été utilisées dans cette partie. La partie en gras est commune à tous les gènes

## B. Résultats complémentaires

### 1. Matériel et méthodes

#### a) Outils bioinformatiques

Les séquences nucléotidiques et protéiques de CD73 et ADK ont été identifiées dans les banques de données NCBI et Xenbase [327]. Les séquences nucléotidiques ont été validées par recherche BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) dans les banques de nucléotides NCBI. Les numéros d'accèsion des séquences de xénope sont regroupés dans la **figure S2 de l'article**.

Les alignements et les pourcentages d'identité entre les différentes séquences protéiques ont été effectués sur le site EMBL-EBI grâce à l'outil CLUSTAL W [419].

Les arbres phylogénétiques ont été générés *via* le site Phylogeny.fr, qui utilise séquentiellement les programmes MUSCLE3.7 pour réaliser les alignements multiples, Gblock 0,91b pour affiner ces alignements, PhyML 3.0 pour faire l'analyse phylogénétique en utilisant le maximum des probabilités et TreeDyn 198.3 pour générer les arbres.

La synténie a été déterminée par comparaison du contexte génomique de *Xenopus tropicalis*, *Danio rerio*, *Gallus gallus*, *Mus musculus* et *Homo sapiens* en utilisant les données Entrez Gene de NCBI pour chaque gène.

#### b) RT-PCR

La spécificité de chaque primer a été obtenue par alignement de chaque couple de primer avec les séquences de chaque homéologue et/ou gène de la même famille, sur le site EMBL-EBI grâce à l'outil CLUSTAL W [84]. Le **tableau 3** présente les résultats obtenus uniquement avec les gènes homéologues.

#### c) Hybridation in situ

##### (1) Obtention des sondes spécifiques

Différentes techniques de biologie moléculaire ont été utilisées pour obtenir des sondes spécifiques pour chaque gène étudié. La stratégie générale est développée dans la **figure 63**, et les détails techniques pour chaque sonde sont donnés dans le **tableau 4** et ci-dessous.

#### Clonages moléculaires

Le clonage moléculaire a été réalisé en suivant les protocoles préconisés par les fournisseurs.

Gène cible	Méthode	ADN d'origine		Taille de la sonde (pb)	Partie de l'ARNm ciblé	Vecteur receveur	Enzyme de linéarisation / ARN polymérase	
		Clone	Vecteur				Sonde anti-sens	Sonde sens
<i>Adora1</i>	<b>Digestion EcoRI/XbaI</b>	AJ249842	pCS2+	990	Phase codante entière	pBluscript SK	EcoRI/T3	XbaI/T7
<i>Adora2a</i> (sonde1)	<b>Digestion XhoI/Pst1</b>	IMAGE 6933545	pDNR-LIB	850	Fin phase codante + 3' UTR	pBluscript SK	PstI/T7	XhoI/T3
<i>Adora2a</i> (sonde2)	<b>PCR 59°C</b> (Primers d'après Lijima, 2008) F ATTGCATTAGTACCGGATTTTGT R TTCTCCACATGTCACITTTGATTTT	ADNc X.laevis cerveau adulte		455	Partie de la phase codante	TA-cloning	XhoI/T3	BamHI/T7
<i>Adora2b</i>	<b>PCR 55°C</b> F TAGCGTGGGGCTACTGG R GATGTGTAAGGCTTCTAAG	ADNc X.laevis cerveau adulte		750	Partie de la phase codante	PCR4-TOPO	PstI/T7	NotI/T3
<i>Adora3</i>	<b>PCR 55°C</b> F TGGAGTGGAACTGTGATTGGAAT R ACATGTCAAGATGTTGGG	ADNc X.laevis cerveau adulte		720	Partie de la phase codante	PCR4-TOPO	PstI/T7	NotI/T3
<i>Nt5e</i>	Fourni par Liz Jones	?	pBluscript SK	901	Fin phase codante + 3' UTR	X	BamHI/T7	XhoI/T3
<i>Alpl</i>	<b>PCR 59°C et digestion XhoI (F/EcoRI (R))</b> F ATCGCTCGAGCAAGCGCAACAGAAAT R GCATGAATTCCTCGCGAAATTCCTCTG	IMAGE 7977142	pExpress-1	380	3'UTR	pBluscript KS	BamHI/T3	XhoI/T7
<i>Ada</i>	<b>PCR 59°C et digestion EcoRI (F/HindIII (R))</b> F CGAATTCGGATTGGACATGGCTAC R GGGAAAGCTTGAAACCTTTGGATG	IMAGE 5506503	pCMV-Sport6	817	Partie de la phase codante	pBluscript SK	XhoI/T3	BamHI/T7
<i>Pnp</i>	Fourni par Deli Shi (Bourdélas, 2009)	3' UTR de BC054317	pGEMT-easy	800	3'UTR	X	PstI/T7	SacII/SP6
<i>Adk</i>	<b>PCR 61°C</b> F GCCCGTACAGAGACCTTGAC R GCACCTGCTGCTGTGATTA	ADNc X.laevis duodenum adulte		1084	Phase codante entière	TA-cloning	BamHI/T7	XhoI/T3
<i>Slc29a1</i>	<b>PCR 61°C</b> F AATGCCCGACAGACCGGTACAA R AGGTAAGTCCGAGGTGCTACCA	ADNc X.laevis estomac adulte		250	5' UTR + début phase codante	TA-cloning	BamHI/T7	XhoI/T3
<i>Slc28a2</i>	<b>PCR 61°C</b> F CTATCCTGAGGTGGAAGAATCA R ATTCCGATAATTGCTGTAGGC	ADNc X.laevis tube digestif postérieur stade 45		365	Partie de la phase codante	TA-cloning	BamHI/T7	XhoI/T3

Tableau 4 : Détails techniques des stratégies de clonage pour l'obtention des sondes spécifiques. Les sites de restriction nécessaires au clonage présent sur les amorces sont soulignés.

Les bactéries DH5α thermo-compétentes sont transformées, étalées sur boîte de Pétri LB-ampicilline 100µg/mL, puis incubées une nuit à 37°C. Le lendemain, une colonie isolée a été cultivée dans 3mL de milieu LB-ampicilline 100µg/mL, de nouveau une nuit à 37°C. Les extractions d'ADN plasmidiques à partir des cultures bactériennes liquides ont été effectuées avec le kit « NucleoSpin Plasmid » (Macherey-Nagel).

Les digestions enzymatiques ont été effectuées avec des enzymes de restriction commercialisées par New England Biolabs, et la déphosphorylation des plasmides digérés a été faite avec la phosphatase alcaline intestinale de veau (CiP, New England Biolabs).

Les PCR ont été faites avec la polymérase Go Taq (1.25U, Promega) grâce à un couple d'amorces spécifiques (400nM chacune), selon le programme suivant : dénaturation initiale 94°C 5min – [dénaturation 94°C 30s -hybridation température différente selon le couple d'amorces 30s – élongation 72°C durée différente selon la longueur de la séquence] X n cycles – élongation finale 72°C 5min.

Les purifications des fragments d'ADN ont été réalisées avec le kit « NucleoSpin Gel and PCR clean-up » (Macherey-Nagel).

La ligation des fragments d'ADN à extrémités cohésives a été effectuée en présence de ligase (1.5U, T4 DNA Ligase, Promega) à température ambiante, une nuit, en condition d'excès molaire d'insert par rapport au vecteur (ratio 1:3) en se basant sur la formule : quantité d'insert = [quantité de vecteur x taille de l'insert / taille du vecteur] x ratio molaire.

Chaque concentration de plasmide ou d'insert a été déterminée sur gel 1% agarose dilué en 1X TAE (Tris, Acetate, EDTA) par comparaison avec les bandes du marqueur de taille SmartLadder (Eurogentec) et pas dosage spectrométrique. Chaque clone plasmidique ou amplifiat de PCR a été vérifié par séquençage par la société Cogenics.

#### Production des sondes marquées DIG

Les sondes ont été générées à partir des plasmides linéarisés et purifiés, par transcription *in vitro*, grâce à une ARN polymérase (40U, Roche), en présence d'UTP couplé à la digoxygénine (DIG RNA labelling, Roche) et d'inhibiteurs de RNases (40U, RNasin Plus Inhibitor, Promega) pendant 2 heures à 37°C. L'ADN plasmidique matrice a été ensuite dégradé par un traitement à la DNase (4U, RQ DNaseI Promega) pendant 15min à 37°C. Les sondes ARN ont été ensuite précipitées avec du 100% éthanol, lavées avec du 70% éthanol dilué en eau, puis remises en suspension dans de l'eau. La quantité des sondes produites a été vérifiée par électrophorèse sur gel 1% agarose dilué en 1X TBE (Tris Borate EDTA).



## (2) Obtention des embryons

Les femelles ont été stimulées hormonalement par des injections de gonadotrophine chorionique humaines (hCG) 4 jours avant la ponte (50 U), puis de nouveau la veille (750 U). Le jour de la ponte, elles sont placées dans des bacs contenant du 1X MMR (Marc's Modified Ringers : 1M NaCl, 20mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20mM CaCl<sub>2</sub>, 50mM HEPES pH7.6, H<sub>2</sub>O). Les ovocytes ont été recueillis dans une boîte de Pétri et badigeonnés avec un morceau de testicule fraîchement prélevé sur un mâle euthanasié. La fécondation a été activée par ajout d'eau. Après dégangage dans une solution de 3% L-cystéine pH7.8 (Sigma-Aldrich), les embryons ont été incubés dans une solution de 0,1X MMR en présence de gentamycine (10µg/mL) jusqu'au stade désiré, déterminé grâce aux tables de Nieuwkoop et Faber. Ils ont ensuite été fixés dans une solution de MEMFA (0,1M MOPS pH 7.4, 0,2mM EGTA, 1mM MgSO<sub>4</sub>, formaldéhyde 4%, H<sub>2</sub>O), pendant 1 heure à température ambiante.

## (3) Protocole

### Perméabilisation

Les embryons ont été déshydratés en bains de concentrations croissantes de 25, 50, 75 et 100% éthanol dilué en eau et placés à -20°C une nuit. Ils ont ensuite été progressivement réhydratés dans du PBS-Tween (1X PBS, 0.1% Tween-20), puis perméabilisés par incubation avec de la protéinase K (10µg/mL) pendant 5min à température ambiante.

### Réduction du bruit de fond

Après ajout d'anhydride acétique en milieu sans amines libres (0.1M triéthanolamine pH7.5), les embryons ont été rincés par des lavages de PBS-Tween. Ils ont de nouveau été fixés par du formaldéhyde 4% pendant 20min, puis lavés plusieurs fois en PBS-Tween.

### Pré-hybridation

Les embryons ont été placés à 60°C pendant 6 heures dans du tampon d'hybridation (50% formamide, 5X SSC, 1mg/mL torula RNA, 1X Denhart, 0.1% Tween-20, 100µg/mL héparine et 10mM EDTA).

### Hybridation

Les sondes-DIG ont été dénaturées pendant 5min à 65°C dans du tampon d'hybridation. La quantité de sonde à diluer a été déterminée après dosage (environ 500ng/mL de tampon d'hybridation).

Les embryons ont ensuite été recouverts de la sonde-DIG anti-sens ou sens correspondante, et ont été incubés une nuit à 60°C.





## Elimination des sondes

Des lavages dans du tampon d'hybridation, puis dans une solution de 2X SSC (Saline Sodium Citrate)-0.1% CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate) ont été effectués à 60°C. Les sondes non fixées ont ensuite été dégradées par incubation des embryons à 37°C dans une solution de RNaseA (10µg/mL) diluée dans du 2X SSC. Puis, les embryons ont de nouveau été rincés par des lavages successifs de 2X SSC et de 0.2X SSC-0.1% CHAPS à 60°C.

## Saturation

Les embryons ont été ensuite placés dans une solution de MAB (0.1M acide maléique pH7.5, 0.15M NaCl, H<sub>2</sub>O) pendant 5 min, puis 15 min, avant d'être incubés 1 heure dans la solution de blocage (MAB, 2% agent bloquant Boehringer, 5% sérum de chèvre décomplémenté).

## Couplage des anticorps

Les embryons ont été incubés une nuit à 4°C avec des anticorps anti-DIG couplés à la PA (Phosphatase Alcaline – Sigma) dilués au 1/2000 dans la solution de blocage.

## Révélation

Après de nombreux lavage en solution MAB, les embryons ont subi deux bains de 15 minutes dans un tampon de coloration (0.1M Tris pH9.5, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1M NaCl, 0.1% Tween-20, 5mM levamisol, H<sub>2</sub>O) avant d'être incubés dans le BM Purple (substrat coloré de l'AP - Roche), à l'obscurité.

## Rinçage et fixation

Lorsque la coloration a été suffisante, les embryons ont été lavés au 1X PBS. Puis, si nécessaire, les traces de coloration non-spécifique ont été éliminées par un premier bain en 50% éthanol dilué en eau, puis en plusieurs bains de 10min en 100% méthanol, jusqu'à ce que la solution ne soit plus colorée, puis de nouveau en éthanol 50%. Les embryons ont enfin été fixés dans une solution de Bouin (9.25% formaldéhyde, 5% acide acétique, H<sub>2</sub>O).

## Dépigmentation

Les embryons ont été rincés avec une solution de 70% éthanol–30% PBS, puis placés dans une solution de dépigmentation (1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 5% formamide, 0.5X SSC, 1X PBS) sur plaque lumineuse, jusqu'à une dépigmentation totale des embryons.

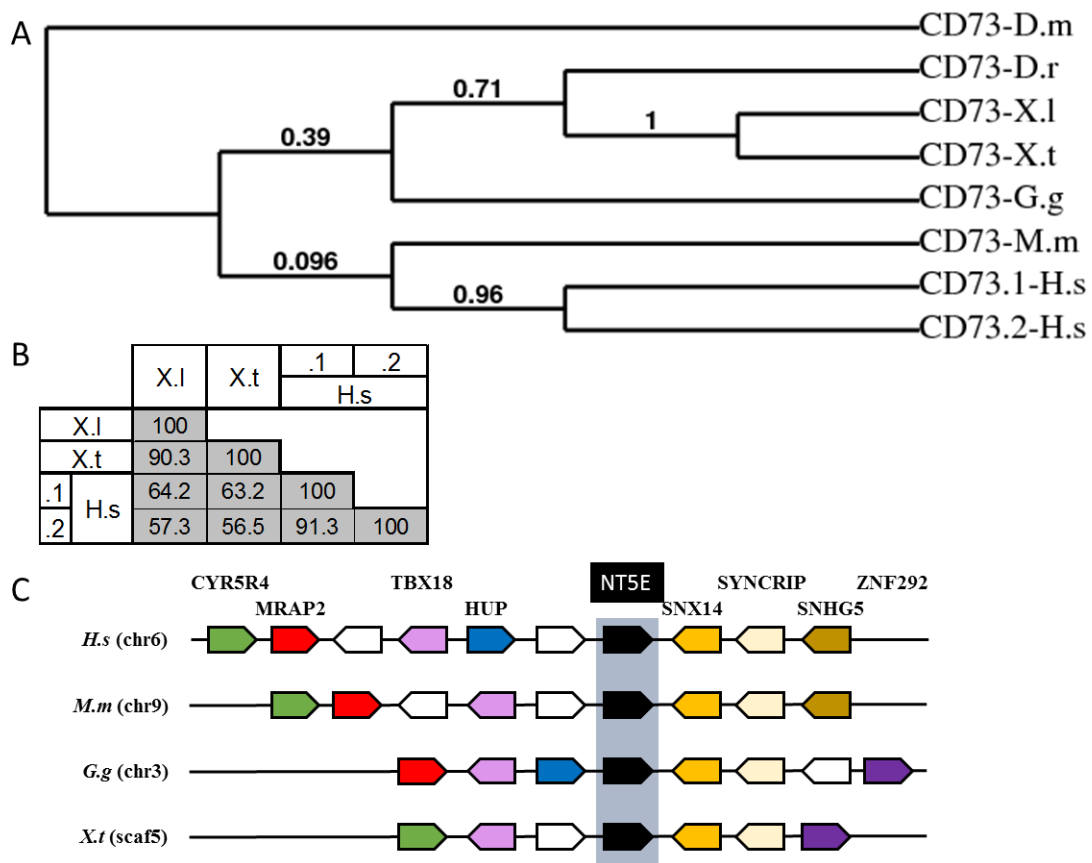


Figure 64 : **Evolution du gène nt5e**. A. Arbre phylogénétique des protéines CD73 des vertébrés. L'arbre phylogénétique a été généré sur la plateforme Phylogeny.fr. Un algorithme groupé a été utilisé pour construire l'arbre. Le ratio de probabilité est indiqué pour chaque nœud de l'arbre. B. Conservation d'identité entre les protéines CD73 de xénope et leurs orthologues humains. Le pourcentage d'identité des acides aminés entre les protéines a été déterminé par alignement par paire, en utilisant le logiciel Clustal W sur le site internet EMBL-EBI. Les numéros d'accèsion GenBank des protéines CD73 sont donnés dans le tableau S2 de l'article et comme suit: CD73-D.m : NP\_725682; CD73-D.r : NP\_957226; CD73-G.g : XP\_004940453; CD73.1- H.s : NP\_002517 CD73.2- H.s : NP\_001191742 ; CD73-M.m : NP\_035981. C. Carte de synténie pour les gènes NT5E dans les génomes des vertébrés. La carte a été produite par comparaison des régions chromosomiques contenant les gènes nt5e des espèces *X.tropicalis*, *G.gallus*, *M.musculus* et *H.sapiens*. Les GeneID d'NCBI sont donnés dans le tableau S1 de l'article et comme suit : nt5e-G.g: 421833; Nt5e-M.m: 23959; NT5E-H.s: 4907. Chaque gène possède un code couleur ; les gènes non conservés sont indiqués en blanc. L'orientation des gènes sur chaque chromosome (chr) est également indiquée. D.m, *Drosophila melanogaster*; D.r, *Danio rerio*; G.g: *Gallus gallus*; H.s, *Homo sapiens*; M.m, *Mus musculus*; X.l, *Xenopus laevis*; X.t, *Xenopus tropicalis*.

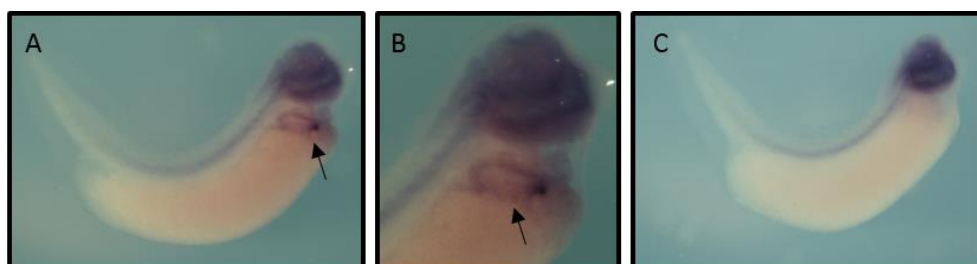


Figure 65: **Expression spatiale de nt5e**. L'expression du gène *nt5e* a été analysée par hybridation *in situ* en utilisant une sonde antisens (A et B) et sens (C). Le marquage dans la tête est aspécifique, car retrouvé avec la sonde sens. Les embryons au stade 37/38 sont photographiés latéralement partie antérieure vers la droite. La flèche représente le marquage au niveau de la veine cardinale commune. (Images de Massé et Jones)

## Observation

Les embryons ont été placés dans du 1X PBS, dans une boîte de Pétri dont le fond est recouvert d'agarose, et l'analyse de la coloration obtenue s'est effectuée sous la lampe binoculaire. Les photographies ont été prises avec une caméra LEICA MZ6 CDF420 et le logiciel Leica application suite, version 2.7.0

## 2. Résultats : Profils d'expression spatio-temporels

Les résultats obtenus par RT-PCR montrent des profils d'expression spécifiques et différents pour chacun des membres de la voie de signalisation de l'adénosine [418]. Au cours de mon travail de thèse, j'ai pu affiner certains profils en réalisant des hybridations *in situ*.

### a) *Nt5e*

#### (1) Phylogénie et synténie

*Nt5e* est un gène unique, pour cette raison, nous n'avons pas présenté son étude *in silico* dans l'article. Cependant, les résultats présentés ici montrent que l'évolution de ses protéines est respectée (**figure 64A**). Les protéines cd73 de *Xenopus laevis* sont conservées et présentent 64,20% d'identité avec le variant humain le plus proche (**figure 64B**). La synténie est également conservée entre les gènes humain, murin, de poulet et de xénope (**figure 64C**).

#### (2) Profil d'expression

Les résultats obtenus par RT-PCR indiquent un profil d'expression spatio-temporel dynamique lors du développement embryonnaire de *X.laevis*. L'expression du gène *nt5e* est maximale lors de la neurulation, mais dans la partie ventrale de l'embryon. Au cours de l'organogenèse, *nt5e* est exprimé dans l'endoderme et le rein au stade 37/38 puis dans tous les organes disséqués au stade 45 avec une plus forte expression au niveau du cœur. Ce fort niveau d'expression au niveau du cœur corrobore le profil d'expression obtenu par hybridation *in situ*. En effet, les travaux initiés au laboratoire du professeur E. Jones, montrent un marquage spécifique au niveau de la veine cardinale commune dans l'embryon aux stades 32, 35 et 37/38 (**figure 65**). Cette veine relie le rein et le cœur au cours de l'embryogenèse [420].

### b) *Récepteurs adora*

Les résultats obtenus par RT-PCR montrent un profil d'expression différent pour les récepteurs *adora1*, *2a*, *2b*, *3.1* et *3.3*, suggérant donc des rôles propres à chacun. Les séquences des primers

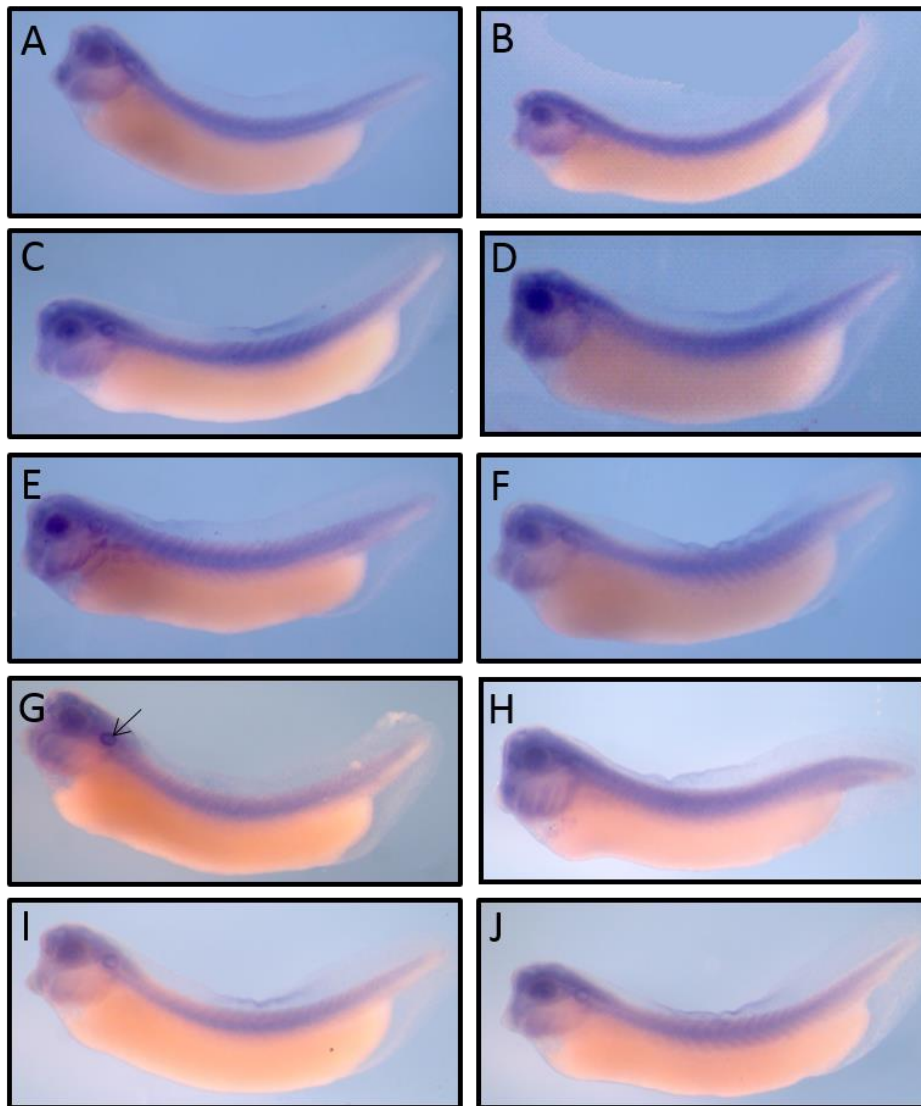


Figure 66 : **Expression spatiale de récepteurs adora au stade 35/36.** L'expression des récepteurs adora1 (A, B), adora2a (C-F), adora2b (G-H) et adora3 (I-J) a été analysée par hybridation *in situ* en utilisant des sondes antisens (A, C, E, G, I) et sens (B, D, F, H, J). Pour le récepteur adora2a, l'hybridation *in situ* a été réalisée avec une sonde produite lors de ce travail (sonde 1) (C, D) et la sonde publiée par [310] (E, F). La flèche marque la vésicule otique. Les embryons sont photographiés latéralement partie antérieure vers la gauche.

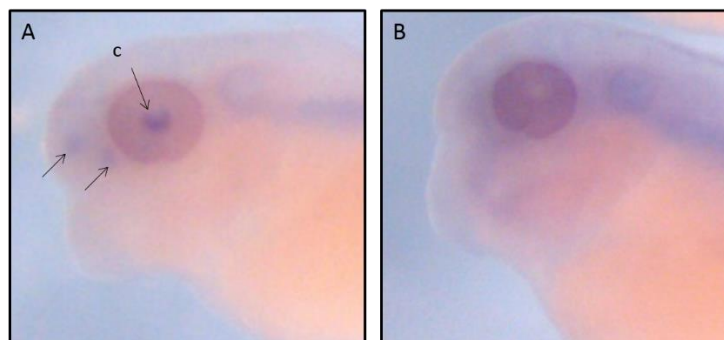


Figure 67 : **Expression spatiale d'*ada*.** L'expression du gène *ada* a été analysée par hybridation *in situ* en utilisant une sonde antisens (A) et sens (B). Le marquage dans la notochorde est aspécifique, car retrouvé avec la sonde sens. Les embryons au stade 37/38 sont photographiés latéralement partie antérieure vers la gauche. c : cristallin

spécifiques aux récepteurs *adora1*, *2a* et *2b* ont été déterminées avant l'identification par BLAST sur la dernière version du génome de *X.laevis* des séquences de leur homéologue. Les analyses de séquences suggèrent que chaque paire de primers utilisé amplifie les deux gènes homéologues (**tableau 3**). De plus, les tailles de ces deux fragments sont trop similaires pour pouvoir les différencier après migration sur gel d'agarose. Concernant *adora2b.b*, sa séquence nucléotidique n'étant pas complète, il est impossible de conclure quant à la spécificité du couple de primer utilisé. Cependant, compte tenu du fort pourcentage d'identité entre les deux séquences connues d'*adora2b.a* et *b*, nous supposons que ce couple de primer reconnaît aussi les deux homéologues.

L'hybridation *in situ* s'est effectuée avec une sonde spécifique pour les récepteurs *adora1*, *2a*, *2b* et *3*, localisée dans la phase codante. De ce fait, ces sondes ne permettent pas de différencier les deux homéologues. Nos résultats ne permettent pas de dégager un profil d'expression spécifique pour chacun (**figure 66**). En effet, tout marquage observé est retrouvé avec les sondes sens, excepté pour les récepteurs *adora2a* et *2b* pour lesquels l'expression dans la vésicule otique semble être spécifique (**figure 66C et G**). Le profil d'expression d'*adora2a* ayant été publié, nous avons reproduit en parallèle les HIS avec notre sonde *adora2a* (sonde 1) et celle utilisée par Lijima *et al.* [310] (sonde 2). Les deux résultats sont semblables et identiques à ceux publiés. Aucune information n'est disponible concernant les résultats obtenus avec la sonde sens dans la publication de Lijima *et al.* Il semblerait donc que le profil d'expression publié soit aspécifique. Nos résultats suggèrent que les récepteurs *adora* sont faiblement exprimés au cours du développement embryonnaire, à un niveau indétectable par hybridation *in situ*.

### c) *Ada*

Pour les mêmes raisons que les gènes *adora*, les primers produits pour établir le profil d'expression d'*ada.1* ne permettent pas de différencier les deux homéologues (**tableau 3**). Par RT-PCR, ces deux homéologues sont exprimés tout au long de l'embryogenèse, même si leur expression est plus faible lors de la neurulation. De plus, leur expression est quasi ubiquitaire, puisque *ada.1* est exprimé dans tous les organes testés, excepté dans le cœur au stade 45.

Cependant, nos résultats obtenus par hybridation *in situ* montrent une expression d'*ada* beaucoup plus restreinte dans l'embryon : au niveau du cristallin et dans deux parties au niveau de la région antérieure de la tête au stade 37/38 (**figure 67**). La sonde que nous avons utilisée reconnaît une partie de la région codante du gène *ada.1a*. Cependant, les séquences codantes des gènes *ada.1a* et *ada.2a* présentent 94,52% d'identité. Il est donc très probable que la sonde reconnaisse les deux homéologues. Le pourcentage d'identité nucléotidique entre les gènes *ada.1* et *ada.2* est de l'ordre de 70%. De plus, les résultats de RT-PCR montrent que *ada.2* n'est exprimé que faiblement à ce stade embryonnaire et

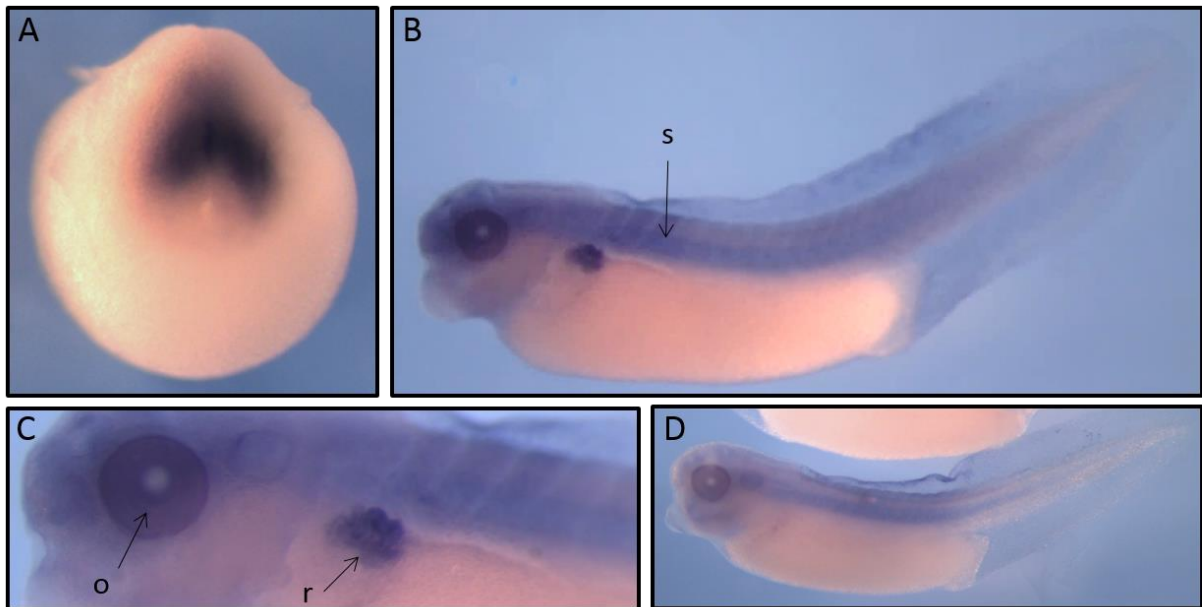


Figure 68: **Profil d'expression spatiale de *pnp* dans l'embryon de *Xenopus laevis*, au cours de l'embryogenèse.** L'expression du gène *pnp* a été analysée par hybridation *in situ* en utilisant une sonde antisens (A-C) et sens (D) aux stades 18 (A) et 37/38 (B-D). Le marquage dans la notochorde et la vésicule otique est aspécifique car retrouvé avec la sonde sens. L'embryon au stade 18 est photographié en vue postérieure. Les embryons au stade 37/38 sont photographiés latéralement partie antérieure vers la gauche. o : œil ; r : rein ; s : somites.

dans la partie ventrale de l'embryon. Ceci suggère que ce profil d'expression est spécifique aux gènes *ada.1*.

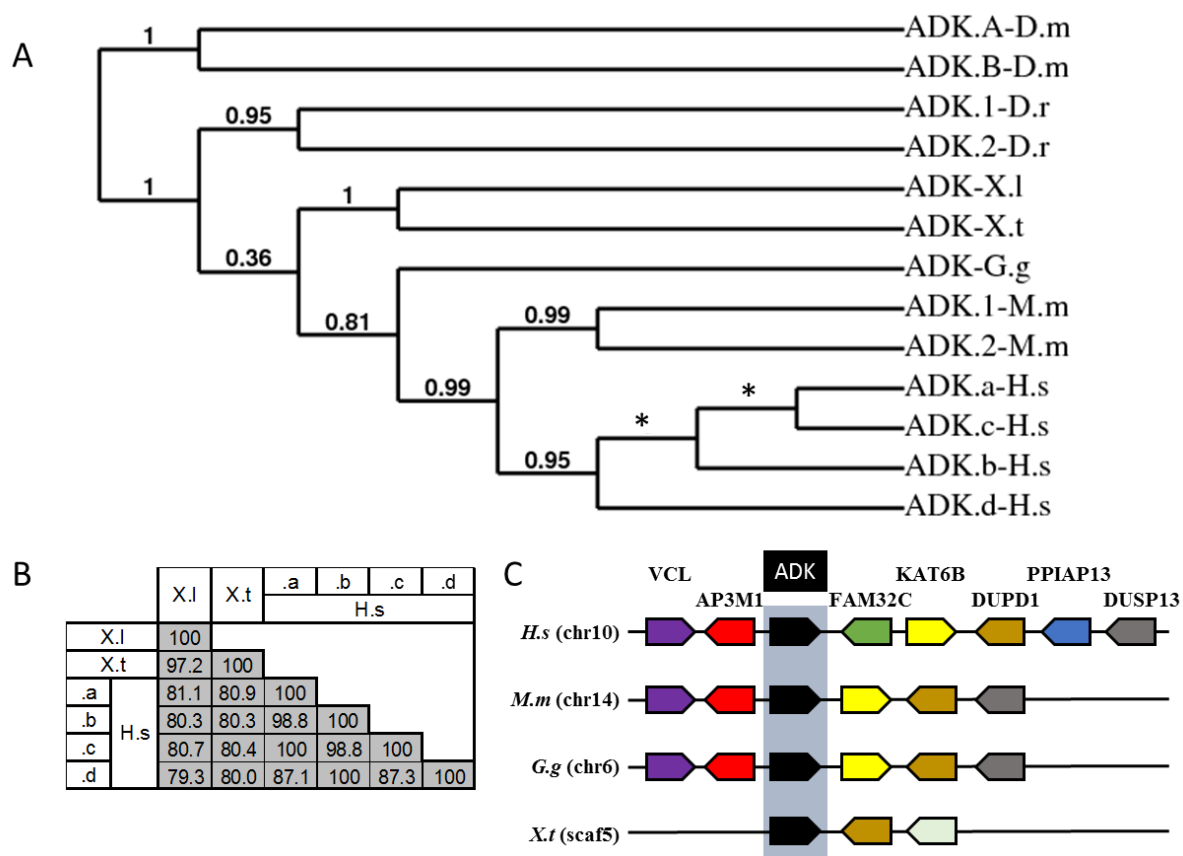
#### d) *Pnp*

Le profil d'expression des deux gènes *pnp* obtenu par RT-PCR est ubiquitaire à partir de la gastrulation (**figures 4 à 6** de [418]). La séquence nucléotidique de *pnp.b* est plus longue en 3' que celle de son homéologue *pnp.a* et recouvre totalement la séquence de *pnp.a* avec un pourcentage d'identité de 84,93%. Il n'a donc pas été possible de déterminer une séquence spécifique au gène *pnp.a* pour établir son profil d'expression. Pour cette raison, un couple de primer utilisé amplifie les deux homéologues *pnp* à la fois (**tableau 3**), alors qu'un autre couple de primer, déterminé dans la partie de la séquence nucléotidique de *pnp.b* ne recouvrant pas celle de *pnp.a*, est spécifique au gène *pnp.b*. L'utilisation de ces différents couples a permis de montrer que ces homéologues ont des profils d'expression différents.

Le profil d'expression spatial de *pnp.a* publié par Bourdelas *et al.* [415] (**figure 68**) est restreint aux tissus neuraux et mésodermiques. Afin de compléter ce profil, nous avons étudié son expression par hybridation *in situ* à des stades différents. Au stade 18 (milieu de neurulation), *pnp.a* est exprimé dans la région postérieure de l'embryon, dans le mésoderme dorsal au vestige du blastopore (**figure 68A**), ce qui correspond à l'expression observée à des stades plus précoces [415] (**figure 68**). Au stade 37/38 (fin d'organogenèse), l'expression de *pnp.a* est spécifique au niveau des somites, de l'œil et fortement dans les tubules proximaux du rein (**figure 68B et C**). Ce profil d'expression n'avait pas été décrit précédemment, puisque le dernier stade observé par Bourdelas *et al.* est le stade 28, en début d'organogenèse. Au stade 37/38, *pnp* est également détecté dans la vésicule otique et dans la notochorde. Cependant, ce marquage dans ces deux tissus n'est pas spécifique car l'embryon hybridé avec la sonde sens présente une expression similaire (**figure 68D**).

Ce profil a été obtenu grâce à l'utilisation d'une sonde localisée dans la partie 3'UTR du gène *pnp.a*, considéré comme unique chez *X.laevis* lors de la publication de Bourdelas *et al* [415]. Cependant, la partie 3'UTR du gène *pnp.b* présente 81,57% d'identité avec celle de *pnp.a*. Il est donc possible que cette sonde puisse s'hybrider sur l'ARNm de *pnp.b*. Nos résultats de RT-PCR montrent que *pnp.b* est fortement exprimé dans le pronéphros à ce stade (**figure 6B**), suggérant que ce marquage par HIS correspond à l'expression de cet homéologue. Il est donc nécessaire de générer une sonde *pnp.b* spécifique (dans la partie 3' terminale de l'ADNc) afin de confirmer cette hypothèse.





**Figure 69 : Evolution du gène *adk*.** **A. Arbre phylogénétique des protéines ADK des vertébrés.** L'arbre phylogénétique a été généré sur la plateforme Phylogeny.fr. Un algorithme groupé a été utilisé pour construire l'arbre. Le ratio de probabilité est indiqué pour chaque nœud de l'arbre. L'astérisque représente une trifurcation où le ratio de probabilité est nul. **B. Conservation d'identité entre les protéines *adk* de xénope et leurs orthologues humains.** Le pourcentage d'identité des acides aminés entre les protéines a été déterminé par alignement par paire, en utilisant le logiciel Clustal W sur le site internet EMBL-EBI. Les numéros d'accèsion GenBank des protéines ADK sont donnés dans le tableau S2 de l'article et comme suit: ADK.A-D.m: NP\_648624; ADK.B-D.m: NP\_729863; ADK.1-D.r: NP\_997956; ADK.2-D.r: NP\_001259013; ADK-G.g: NP\_001006501; ADK.1-M.m: NP\_598840; ADK.2-M.m: NP\_001229970; ADK.a-H.s: NP\_001114; ADK.b-H.s: NP\_006712; ADK.c-H.s: NP\_001189378; ADK.d-H.s: NP\_001189379. **C. Carte de synténie pour les gènes ADK dans les génomes des vertébrés.** La carte a été produite par comparaison des régions chromosomiques contenant les gènes ADK des espèces *X.tropicalis*, *G.gallus*, *M.musculus* et *H.sapiens*. Les GeneID d'NCBI sont donnés dans le tableau 2 de l'article et comme suit : ADK-G.g: 423735; ADK-M.m: 11534; ADK-H.s: 132. Chaque gène possède un code couleur ; les gènes non conservés sont indiqués en blanc. L'orientation des gènes sur chaque chromosome (chr) est également indiquée. D.m, *Drosophila melanogaster*; D.r, *Danio rerio*; G.g: *Gallus gallus*; H.s, *Homo sapiens*; M.m, *Mus musculus*; X.l, *Xenopus laevis*; X.t, *Xenopus tropicalis*.

## e) *ADK*

### (1) Phylogénie et synténie

*Adk* étant un gène unique, nous n'avons pas présenté son étude *in silico* dans l'article. Cependant, les résultats présentés ici montrent que l'évolution de ses protéines est respectée (**figure 69A**). Les protéines *adk* de *Xenopus laevis* sont conservées et présentent 81,6% d'identité avec le variant humain le plus proche (**figure 69B**). La synténie est également conservée entre les gènes humain, murin, de poulet et de xénope (**figure 69C**).

### (2) Profil d'expression

Comme nous l'avons vu dans l'article (**figures 4 à 6**), l'expression du gène *adk* est constante au cours du temps et ubiquitaire dans l'embryon.

Afin de mieux caractériser ce profil d'expression, nous avons étudié l'expression du gène *adk* à différents stades embryonnaires par hybridation *in situ*. Aux stades précoces, l'expression d'*adk* est dynamique. En effet, son expression n'est pas détectée lors de la segmentation (**figure 70A**), mais elle se situe dans l'ectoderme à la fin de la gastrulation (**figure 70B**), puis au niveau de la plaque neurale au début de l'organogenèse (**figure 70C**). Au cours de l'organogénèse, son expression devient ubiquitaire. Au stade 32, les transcrits d'*adk* sont détectés dans un grand nombre de tissus/organes de l'embryon (**figure 70E à H**) : œil, arcs branchiaux, oreille, rein (tubules proximaux, intermédiaires, distaux, connecteurs), somites et muscles hypaxiaux, îlot sanguin ventral et enfin épiderme.



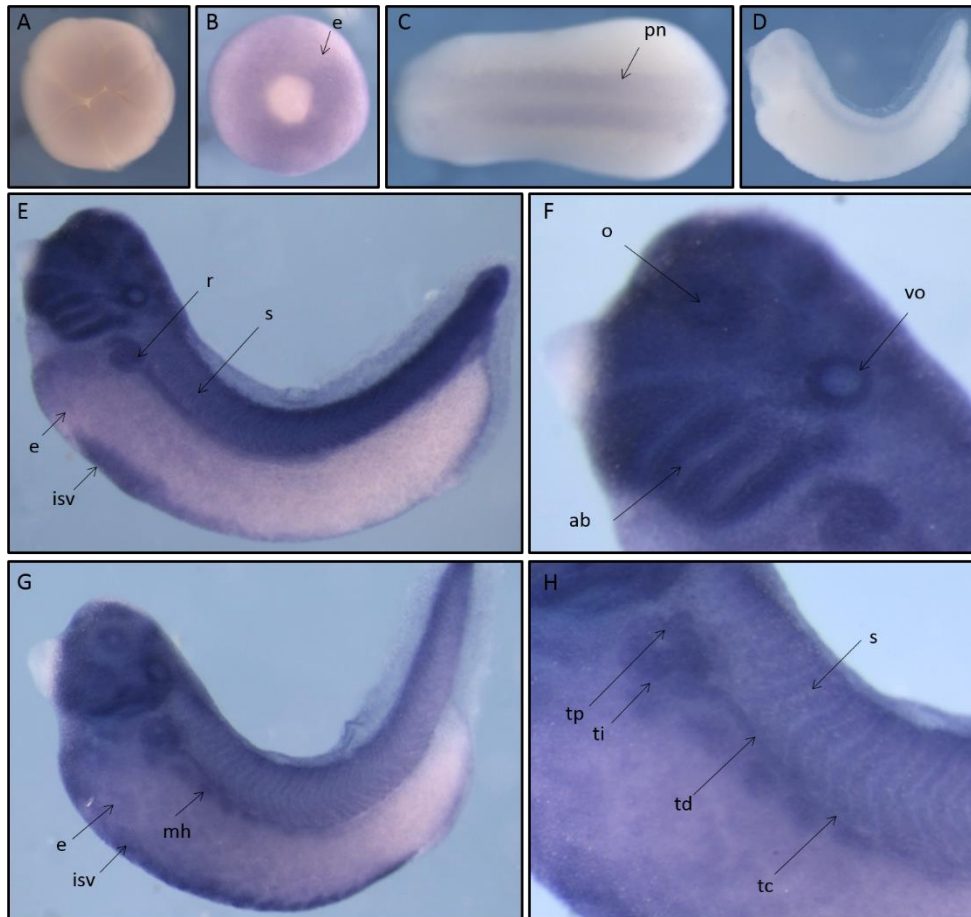


Figure 70: **Profil d'expression spatiale d'*adk* dans l'embryon de *Xenopus laevis***, au cours de l'embryogenèse. L'expression du gène *adk* (a été analysée par hybridation *in situ* en utilisant une sonde antisens (A-C et E-H) et sens (D) aux stades 5 (A), 12 (B), 20 (C), 32 (D-F) et 37/38 (G-H). L'embryon au stade 5 est photographié en vue du pôle animal (A), l'embryon au stade 12 en vue du pôle végétatif (B) et l'embryon au stade 22 en vue dorsale (C). Les embryons aux stades 32 et 37/38 (D-H) sont photographiés latéralement partie antérieure vers la gauche. F et H sont des zooms de la partie antérieure des embryons aux stades 32 et 37/38. ab : arcs branchiaux ; e : ectoderme/epiderme ; isv : îlot sanguin ventral ; mh : muscles hypaxiaux ; o : œil ; pn : plaque neurale ; r : rein ; s : somites ; tc : tubule connecteur ; td : tubules distaux ; ti : tubules intermédiaires ; tp : tubules proximaux ; vo : vésicule otique

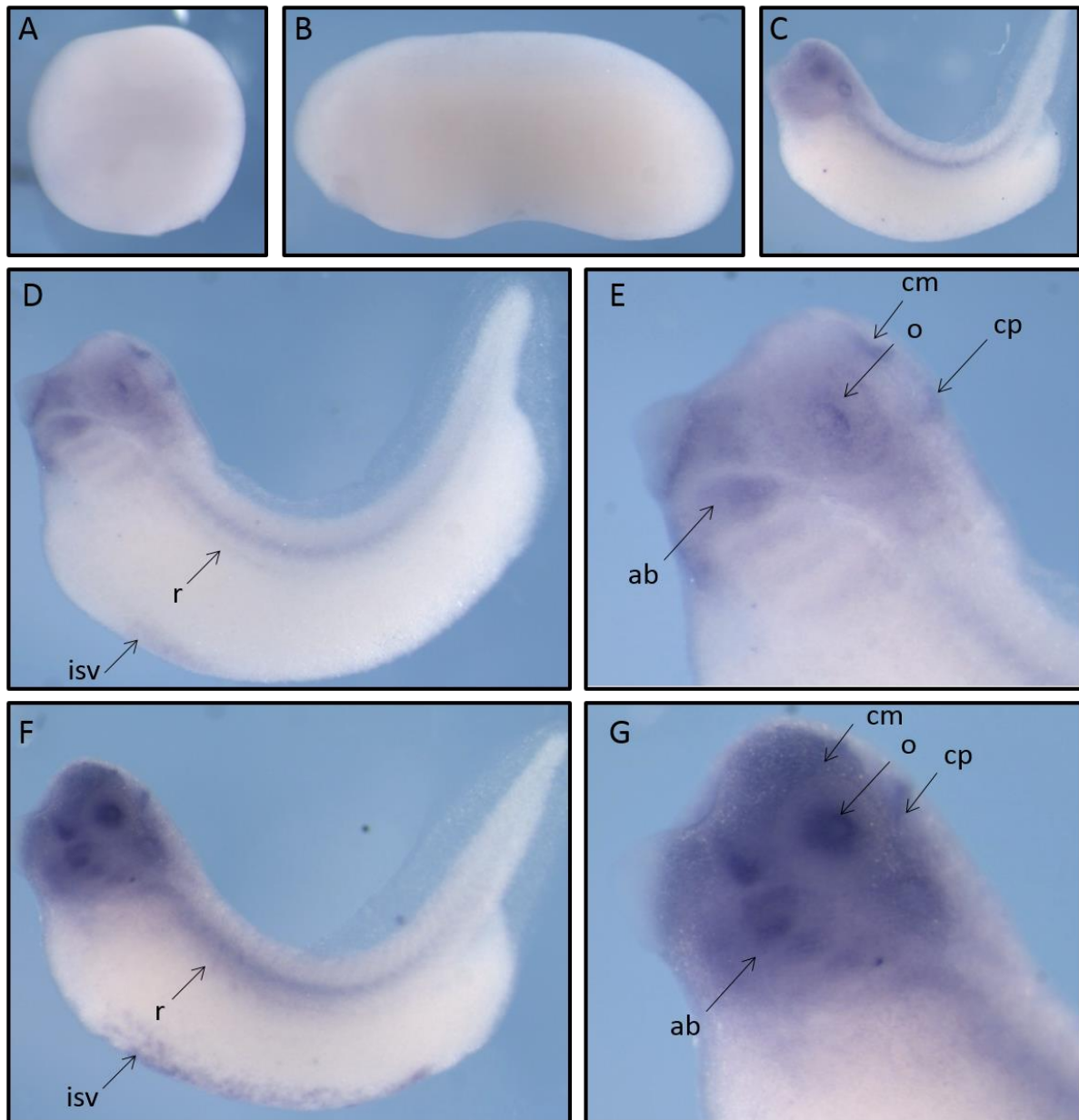


Figure 71: **Profil d'expression spatiale de *slc29a1* dans l'embryon de *Xenopus laevis*, au cours de l'embryogenèse.** L'expression du gène *slc29a1* a été analysée par hybridation *in situ* en utilisant une sonde antisens (A, B et D-G) et sens (C) aux stades 19/20 (A), 24 (B), 32 (D,E) et 37/38 (C,F,G). Les embryons sont photographiés latéralement partie antérieure vers la gauche, sauf l'embryon au stade 19/20 en vue dorsale (A). E et G sont des zooms de la partie antérieure des embryons aux stades 32 et 37/38. ab : arcs branchiaux ; c.m : cerveau moyen ; cp : cerveau postérieur ; isv : îlot sanguin ventral ; o : œil, r : rein.

#### f) *Slc29a1*

Les séquences du couple de primers spécifiques à *slc29a1* utilisés pour établir son profil d'expression ont été déterminées avant la découverte du deuxième homéologue, à partir de la séquence nucléotidique de *slc29a1.a*. Bien que les séquences des deux homéologues présentent un pourcentage d'identité de 86,94%, les primers sont spécifiques du gène *slc29a1.a* (**tableau 3**). Par RT-PCR, le transporteur *slc29a1.a* est exprimé à partir de la fin de la neurulation (stade 21), avec un niveau d'expression croissant jusqu'à la fin de l'organogenèse (**figure 5** de [418]). De plus, ce gène est détecté dans tous les tissus embryonnaires testés à partir du stade 24 (organogenèse), mais son expression semble plus forte au niveau de la tête (**figure 6** de [418]).

Afin de détailler ce profil d'expression, nous avons utilisé une sonde spécifique de *slc29a1*. La sonde a été clonée à partir d'une partie 5'UTR et du début de la séquence codante du gène *slc29a1.a*. Cependant, la séquence de cette sonde présente 87,65% d'identité avec la séquence nucléotidique de *slc29a1.b* et il est donc très probable que la sonde s'hybride avec les deux transcrits. Nos résultats d'hybridation *in situ* confirment nos résultats obtenus par RT-PCR car, d'une part, aucun marquage n'est détecté avant la phase d'organogénèse et d'autre part l'expression est plus forte au niveau de la partie antérieure de l'embryon (**figure 71**). Au stade 32, son expression est détectée au niveau du cerveau moyen et postérieur, des arcs branchiaux et dans l'œil (D-E). Une expression plus faible est détectée dans l'îlot sanguin ventral et le rein. Au stade 37/38, *slc29a1* est toujours exprimé dans ces mêmes tissus et organes, mais avec un niveau d'expression qui s'intensifie au niveau des arcs branchiaux et de l'îlot sanguin ventral (F-G). Le contrôle sonde sens indique que l'expression au niveau de l'œil, de l'oreille et de la notochorde est aspécifique (C).

Des images d'hybridation *in situ* sont disponibles sur Xenbase et confirment nos résultats. Cependant, aucune indication concernant les marquages obtenus avec le contrôle sonde sens n'est disponible. Notre travail montre que l'expression dans l'œil et l'oreille publiée sur Xenbase est aspécifique. Ceci conforte l'utilisation de la sonde sens correspondante à la sonde antisens pour vérifier la spécificité du marquage.

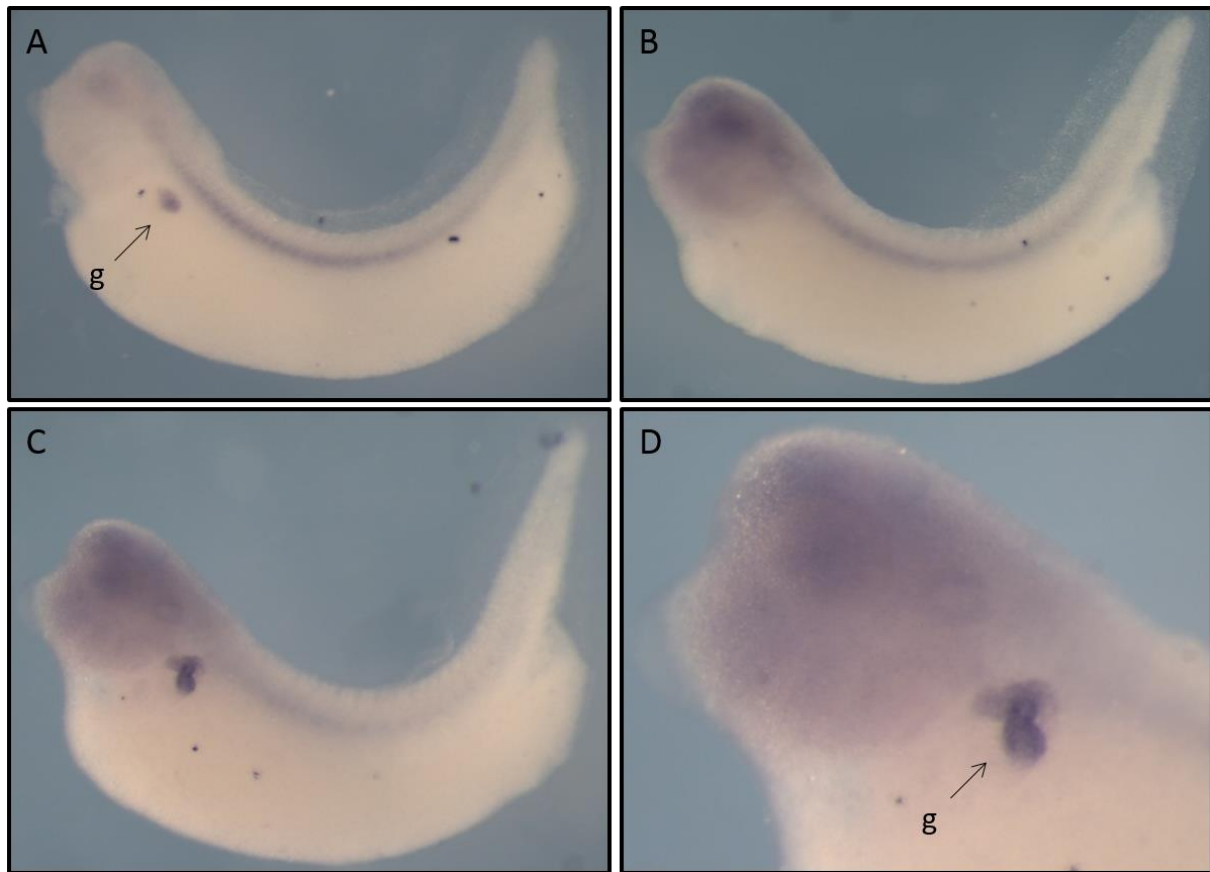


Figure 72: **Profil d'expression spatiale de *slc28a2* dans l'embryon de *Xenopus laevis*, au cours de l'embryogenèse.** L'expression du gène *slc28a2* été analysée par hybridation *in situ* en utilisant une sonde antisens (A, C et D) et sens (B) aux stades 32 (A), et 37/38 (B-D). Les embryons sont photographiés latéralement partie antérieure vers la gauche. D est un zoom de la partie antérieure de l'embryon en C. g : glomérule.

#### g) *Slc28a2*

Le profil d'expression du transporteur *slc28a2* est plus spécifique que le gène précédant. Par RT-PCR, *slc28a2* est exprimé au cours de la segmentation, très faiblement pendant la gastrulation, puis son niveau d'expression augmente de manière croissante à partir de la neurulation (**figure 5** de [418]). Aux stades les plus tardifs, l'expression de *slc28a2* est détectée uniquement dans le rein, l'œil et le tube digestif (**figure 6** de [418]). Les images d'hybridation *in situ* disponibles sur Xenbase montrent que *slc28a2* n'est pas détecté avant le stade 31 et il est exprimé au niveau du rein, de la tête et de la vésicule otique au stade 37/38 au cours de l'embryogénèse de *X.tropicalis*.

Les images obtenues par la même méthode montrent une expression de *slc28a2* à partir du stade 32 chez *X.laevis*. De plus, son expression spatiale est très spécifique : elle est localisée uniquement au niveau du rein, certainement le glomérule (**figure 72**). Au stade 37/38, cette spécificité d'expression reste la même, avec une expression exclusive au niveau rénal. Des coupes transversales doivent être réalisées afin de préciser le domaine d'expression pronéphrique : glomérule ou tubules proximaux. Ce résultat concorde avec les images disponibles sur Xenbase, cependant, mon travail démontre que l'expression au niveau de la tête et de la vésicule otique n'est pas spécifique du transporteur *slc28a2*.

#### h) *Alpl*

Les résultats obtenus pour *alpl* ont attiré notre attention de par son expression spécifique et dynamique dans l'œil et le rein. Pour cette raison, les études *in silico* et le profil d'expression détaillé de ce gène seront présentés dans la deuxième partie de ma thèse. Ces résultats, ainsi que l'étude fonctionnelle du gène *alpl* feront l'objet d'un second article.



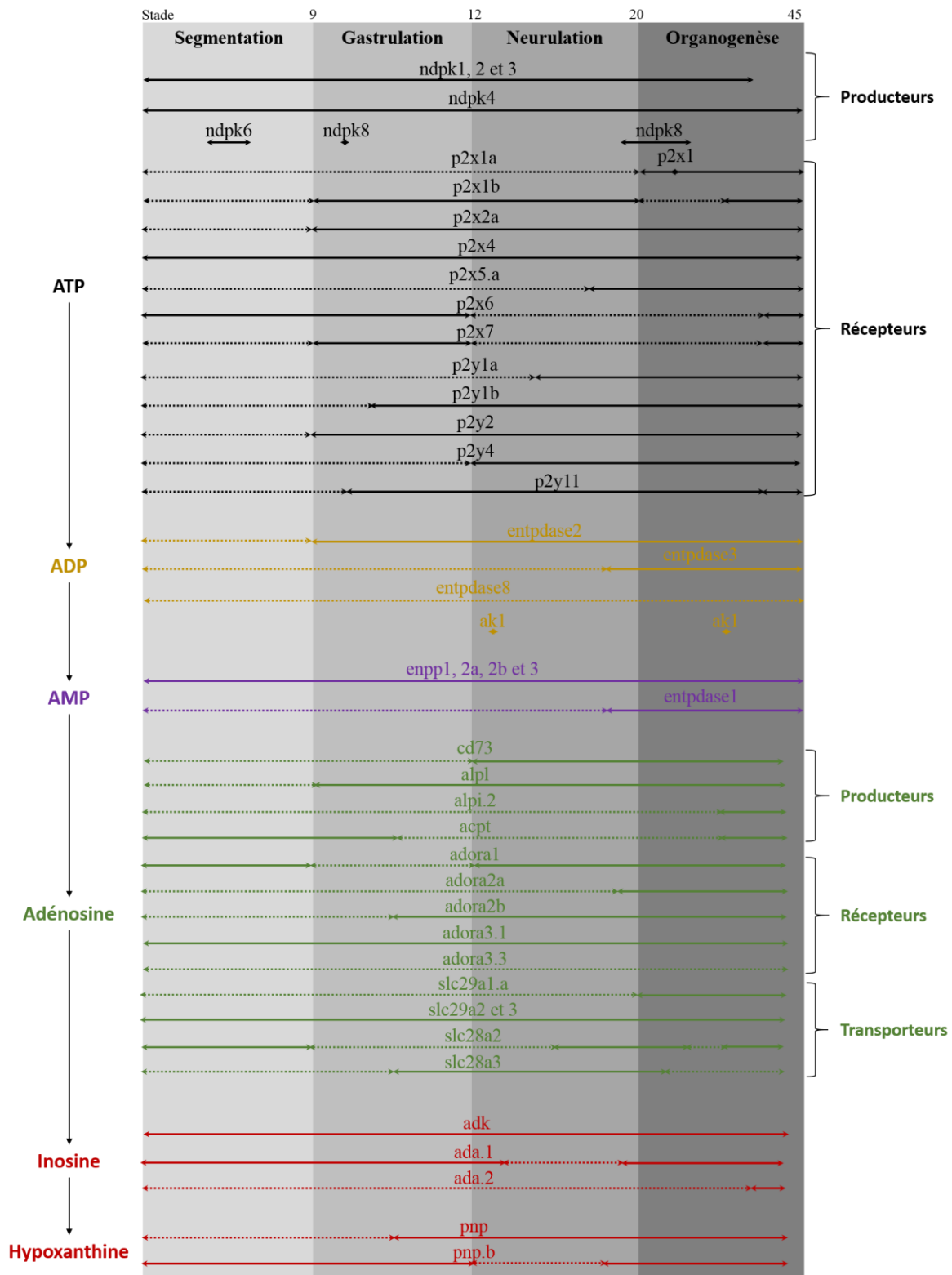


Figure 73 : Carte d'expression temporelle de la voie de signalisation purinergique au cours du développement embryonnaire de *Xenopus laevis*. Chaque molécule et ses enzymes producteurs sont associés à une couleur. Pour l'ATP et l'adénosine, les récepteurs et/ou transporteurs associés sont également représentés par la même couleur et sont indiqués par une accolade. Les flèches pleines représentent les stades où les acteurs sont exprimés, et les flèches en pointillés, les stades où ils ne sont pas exprimés.

### 3. Conclusion et discussion

Grâce à ces différents profils d'expression obtenus par RT-PCR et hybridation *in situ*, j'ai pu compléter la carte d'expression spatio-temporelle comparative des différents acteurs de la voie de signalisation purinergique. La carte d'expression temporelle est présentée en **figure 73**. Les résultats obtenus concernant leur expression spatiale au cours de la neurulation et de l'organogenèse sont résumés dans le **tableau 5**.

Nous pouvons voir dans l'embryon entier, que bien que la molécule d'ATP puisse être directement libérée dans l'espace extracellulaire, elle peut également être produite à partir de l'ADP par les ndpks. Il existe également au moins un récepteur spécifique de l'ATP à chaque étape du développement embryonnaire, suggérant une implication de cette purine extracellulaire au cours de l'embryogénèse. De même, l'ADP et l'AMP peuvent également être générées au cours du développement embryonnaire. Cependant, leur seule source de production maternelle provient des ectonucléotidases enpp *via* l'hydrolyse de l'ATP. Contrairement à la concentration d'ATP élevée dès les premiers stades de développement, les quantités d'ADP et d'AMP sont faibles (21,7 pmol/embryon et 14,8 pmol/embryon – **figure 7** de [418]). Ceci suggère que l'ADP pourrait déjà être stockée dans l'ovocyte, soit au cours du développement produit à l'intérieur d'un blastomère pour être ensuite libéré par exocytose [9]. Nous pouvons également voir qu'à l'échelle de l'embryon, tout au long du développement, il existe des enzymes permettant de produire l'adénosine (cd73 et phosphatases alcaline et acide), et aussi de la dégrader (adk et ada). Au moins un récepteur adora et un transporteur nucléosidique sont également présents à chaque stade embryonnaire, suggérant une implication de l'adénosine extracellulaire au cours de l'embryogénèse. Cependant, comme nous avons pu voir dans l'article, la concentration en adénosine est très faible au cours de l'embryogenèse, et cette propriété semble être importante pour un développement embryonnaire normal. Les acteurs de la voie de signalisation de l'adénosine ont certainement le rôle de réguler et maintenir sa concentration basse dans l'espace extracellulaire. Ces données ne nous permettent pas de différencier les concentrations intracellulaires et extracellulaires de ces purines. Les concentrations élevées d'ATP sont certainement liées à la forte valeur énergétique nécessaire à l'embryon pour son développement. Cependant la présence des récepteurs P2 ATP-dépendants suggèrent l'implication de l'ATP en tant que molécule de signalisation.

Les résultats de RT-PCR laissent suggérer une régulation spatiale et aussi temporelle de la concentration des purines, notamment celle de l'adénosine. Au cours de ce travail, j'ai tenté de mesurer la concentration d'adénosine dans des tissus donnés de deux manières différentes. La première a été de réaliser les mesures d'HPLC à partir de tissus disséqués d'embryons à différents stades. Cependant, ces mesures n'ont pas plus été exploitées du fait de la dégradation non spécifique de l'ATP par altérations métaboliques causées par les dissections. En effet, des ratios ATP /ADP anormaux étaient obtenus.

Gène	Domaine d'expression		Références
	neurulation	organogénèse	
<i>entpdase1</i>	Notochorde (St.19)	Ilots sanguins, somites, notochorde, oeil (St.39)	Massé et al., 2006
<i>entpdase2</i>	Somites (St.19)	Somites, muscles hypaxiaux, cœur (St.39)	Massé et al., 2006
<i>entpdase3</i>	n.d.	Moelle épinière dorsale, ganglions trijumeaux, cerveau antérieur (St.39)	Massé et al., 2006
<i>enpp1</i>	n.d.	Ilot sanguin ventral, vasculature, cœur, sinus rénal (St.37/38)	Massé et al., 2010
<i>enpp2a</i>	Crêtes neurales, somites, placodes (St.20)	Nageoires, somites, arcs branchiaux, système nerveux (St.37/38)	Massé et al., 2010
<i>enpp2b</i>	Système nerveux, somites, oeil (St.20)	Large domaine d'expression (somites, rein, oeil, oreille, système nerveux...) (St.37/38)	Massé et al., 2010
<i>nm23-X1/ndpka</i>	Tube neural (St.17)	Large domaine d'expression (cerveau, oeil, arcs branchiaux, somites, rein, épiderme...) (St.35/36)	Mouchizuki et al., 2009 ; Ouatas et al., 1998
<i>nm23-X2/ndpkb</i>	Ubiquitaire (St.17)	Large domaine d'expression (cerveau, oeil, arcs branchiaux, somites, épiderme...) (St.33/34)	Mouchizuki et al., 2009 ; Ouatas et al., 1998
<i>nm23-X3/ndpkc</i>	Plaque neurale (St.17)	Tête (œil, arcs branchiaux, oreille, cerveau), moelle épinière (St.33/34)	Mouchizuki et al., 2009 ; Ouatas et al., 1998
<i>nm23-X4/ndpkd</i>	Bourrelets neuronaux, oeil présumé (St.18)	Tête (œil, oreille, cerveau), moelle épinière, rein (St.35)	Mouchizuki et al., 2009
<i>ak1</i>	Mésoderme paraxial (St.13)	Somites, arcs branchiaux, épiderme (St.28)	Xenbase±
<i>p2y1</i>	n. a.	Cerveau, moelle épinière, muscles myotomes (St. 28)	Cheng et al., 2001
<i>p2y4 (Xlp2y)</i>	Plaque neurale (St.17)	Système nerveux (St.28)	Bogdanov et al., 1997
<i>p2y11</i>	Tube neural (St.17)	Large domaine d'expression (cerveau, oeil, oreille, arcs branchiaux, notochorde, somites, rein...) (St.28)	Devader et al., 2007
<i>nt5e</i>	n.d.	Veine cardinale commune (St.32 ; 37/38)	Massé K. and Jones E., non publié
<i>alpl</i>	n.a.	Œil (rétine, ZMC) (St.39)	Parain et al., 2011
<i>alpl</i>	Plaque neurale ? (St.15/16)	Œil (rétine, ZMC), rein (St.33/34) (est-ce que je met tous les stades que j'ai fait??)	Ce travail
<i>ada.1</i>	n.a.	Œil (cristallin), ??? (St.37/38)	Ce travail
<i>pnpp</i>	Plaque neurale (couche profonde), mésoderme (postérieur) (St.15)	Mésoderme non segmenté/ tissu neural postérieur (St.28)	Bourdela et al., 2009
<i>pnpp</i>	Mésoderme dorsal (St.18)	Rein, somites, oeil (St.37/38)	Ce travail
<i>adk</i>	Plaque neurale (St.20)	Ubiquitaire (œil, oreille, arcs branchiaux, cerveau, rein, somites, épiderme) (St.32 et 37/38)	Ce travail
<i>adora2a *</i>	n.a.	Large domaine d'expression (somites, oeil, arcs branchiaux, cerveau) (St.28)	Lijima et al., 2008 ±
<i>slc28a2</i>	n.d.	Rein (St.37/38)	Xenbase±
<i>slc28a2</i>	n.d.	Rein (St. 32 et 37/38)	Ce travail
<i>slc29a1</i>	n.d.	Ilot sanguin ventral, rein, oeil, cerveau (St.37/38)	Xenbase±
<i>slc29a1</i>	n.d.	Ilot sanguin ventral, rein, cerveau (St.32 et 37/38)	Ce travail
<i>slc29a2</i>	Tube neural (St.17)	Large domaine d'expression (somites, îlot sanguin ventral, oeil, cerveau) (St.37/38)	Xenbase±
<i>slc29a3</i>	n.d.	Rein, tête (St.37/38)	Xenbase±

Tableau 5: Récapitulatif des profils d'expression spatiale des membres de la voie de signalisation purinergique chez le xénope. n.d. non détecté ; n.a : non analysé ; \*profil d'expression non confirmé par ce travail de thèse ; ± pas d'informations concernant la sonde contrôle sens.

La seconde approche a été par l'utilisation de biosenseurs [421, 422]. Ces microélectrodes permettent de mesurer la concentration en purine dans un organe ou un tissu donné, directement dans l'embryon. Cette technique est basée sur la détection de molécules d' $H_2O_2$  formées par les enzymes de dégradation du métabolite mesuré, entraînant la formation d'un signal électrique quantifiable. La **figure 74** présente la réaction chimique s'effectuant dans un biosenseur spécifique de l'adénosine. Au cours de ma thèse, j'ai pu être initiée à cette technique au laboratoire du professeur Nicholas Dale à l'université de Warwick (School of Biological Sciences). Cependant, en raison de problèmes techniques lors de la génération de ces biosenseurs, les résultats de mesure n'ont pas été concluants. L'élaboration de cette carte d'expression spatio-temporelle permet de mettre en évidence des tissus ou organes présentant une expression forte de ces acteurs de la voie de signalisation purinergique.

Au moment de la neurulation, de nombreux acteurs de la voie de signalisation purinergique sont exprimés dans les tissus neuraux (**tableau 5**), suggérant leur rôle dans la mise en place du système nerveux de l'embryon. Les enzymes produisant l'ATP (*nm23*), l'AMP (*enpp2a* et *enpp2b*) et l'adénosine (*alpl*), les récepteurs *p2y4* et *p2y11*, les enzymes dégradant l'adénosine (*pnp* et *adk*) et le transporteur *slc29a2* présentent tous une expression au niveau de la plaque ou du tube neural au cours de la neurulation. Par RT-PCR, nous avons démontré la présence majeure des différents acteurs de la voie de signalisation de l'adénosine dans la plaque neurale au stade 15. Outre l'expression des enzymes pouvant produire l'adénosine (*alpl* et plus faiblement *nt5e*), les récepteurs *adora1*, *2a* et *2b*, ainsi que les transporteurs *slc29a3* et *slc28a3* sont aussi détectée dans la plaque neurale. Le gène *ada.1* est faiblement détecté dans ce tissu. Chez la souris, l'inhibition de l'expression des récepteurs *adora1*, *2a* provoque des anomalies de la fonction cérébrale [211, 212]. Cependant, aucun défaut neuronal suggérant une malformation du système nerveux n'a été observé. L'absence d'*alpl* chez la souris entraîne quant à elle une malformation du tube neural [423]. Cependant, compte tenu de la diversité de substrat de cette enzyme, cette altération ne résulte peut être de production anormale de l'adénosine. La littérature ne permet donc pas de démontrer le rôle de la voie de signalisation de l'adénosine lors de la neurogenèse. Cependant, l'expression de la quasi-totalité des acteurs de la voie de signalisation de l'adénosine dans les tissus neuraux de l'embryon de *Xenopus laevis* suggère encore une fois la nécessité de réguler la concentration de l'adénosine extracellulaire pour permettre le développement normal du système nerveux. Des études fonctionnelles de ces acteurs sont donc nécessaires pour élucider les fonctions de l'adénosine au cours de la mise en place du système nerveux.

Au cours de l'organogenèse, un grand nombre d'acteurs du métabolisme purinergique sont exprimés dans les tissus musculaires (**tableau 5**). Nos résultats d'hybridation *in situ* couplées avec ceux publiés par d'autres équipes montrent que les enzymes producteurs d'ATP (*ndpka* et *b*), d'ADP (*entpdase2* et *ak1*) et d'AMP (*entpdase1* et *enpp2a* et *b*) et d'adénosine (*enpp2*), les enzymes de

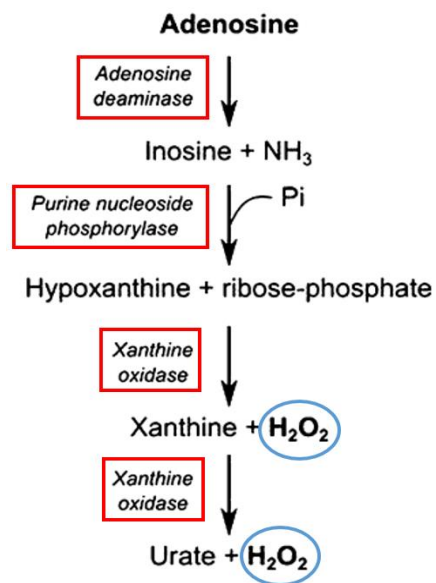


Figure 74: **Réaction chimique ayant lieu dans les biosenseurs spécifiques à l'adénosine.** Les enzymes présents dans le biosenseur sont encadrés en rouge (ada, pnp et xo) et les molécules d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produites et entraînant un signal électrochimique sont entourées en bleu. D'après [422].

dégradation de l'adénosine (*adk*) et de l'inosine (*pnp*), ainsi que les récepteurs p2 (*p2y11* et *p2x5* (Blanchard et Massé)) et le transporteur *slc29a2* sont exprimés dans les somites. Le récepteur *p2y1* est exprimé dans les myotomes et les transcrits des enzymes de production de l'ADP (*entpdase2*) et de dégradation de l'adénosine (*adk*) sont également détectés dans les muscles hypaxiaux. Par RT-PCR, les gènes *alpl*, *acpt*, *ada.1*, les quatre récepteurs *adora* et les transporteurs équilibratifs de nucléosides sont aussi détectés dans les somites (**figure 6** de [418]). Ceci laisse suggérer un rôle pour cette voie de signalisation lors de la somitogénèse. En effet, l'administration d'agonistes des récepteurs *adora*, mimant une forte concentration en adénosine, entraîne des défauts de formation des somites et la réduction de l'expression du marqueur musculaire *myoD* [310]. Ces résultats suggèrent qu'un excès d'adénosine n'est pas favorable au développement normal des muscles chez l'embryon et que la concentration en adénosine doit y être contrôlée et régulée. Il n'est donc pas étonnant de trouver une expression des enzymes de dégradation de l'adénosine comme *ada*, *adk* et *pnp*, alors que l'enzyme de production principal de l'adénosine *nt5e* n'y est pas exprimé. Par contre, les phosphatases *alpl* et *acpt*, permettant la production d'adénosine, sont détectées par RT-PCR dans les somites. Cependant, ces enzymes possèdent divers substrats et pourraient intervenir dans les somites *via* d'autres propriétés.

La voie de signalisation purinergique semble aussi avoir un rôle au niveau du système cardiovasculaire au cours de l'organogénèse. Les enzymes de production de l'AMP (*entpdase1*, *enpp1*) et les transporteurs nucléosidiques *slc29a1* et 2 sont exprimés dans les îlots sanguins, à l'origine des cellules hématopoïétiques. L'un des sites majeurs d'expression des gènes de cette voie de signalisation est le cœur. Les enzymes de production de l'ADP (*entpdase2*) et de l'AMP (*enpp1*) y sont détectés par hybridation *in situ*. De plus, la quasi-totalité des acteurs de la voie de signalisation de l'adénosine est donc exprimée dans le tissu cardiaque : les enzymes produisant l'adénosine (*nt5e*, *alpl* et *acpt*), dégradant l'adénosine (*adk*) et l'inosine (*pnp*), ainsi que les récepteurs *adora 2a*, *2b* et *3.1* et les transporteurs *slc29a2* et 3 sont également détectés dans le cœur à la fin de l'organogénèse (stade 45) par RT-PCR (**figure 6** de [418]). Seule l'enzyme *ada*, faisant le lien entre l'adénosine et l'inosine extracellulaire est absente. Pourtant, la dégradation de l'adénosine semble nécessaire dans le cœur lors de l'embryogénèse, car un excès d'adénosine dans ce tissu est néfaste pour l'embryon. En effet, chez la souris, la sur-expression du récepteur *adora1* sous le contrôle d'un promoteur cardiaque entraîne des défauts de la morphologie et de la fonction cardiaque [246]. De plus, chez le poulet, l'administration d'agoniste des récepteurs *adora* entraîne des anomalies de la boucle cardiaque [299]. Compte tenu de l'importance de la régulation de la concentration en adénosine au niveau cardiaque, il est possible que l'adénosine soit recyclée à l'intérieur de la cellule grâce aux transporteurs de nucléotides spécifiques de l'adénosine, puis que la molécule soit dégradée en intracellulaire par l'*adk*. Enfin, les transcrits de l'enzyme de production de l'AMP (*enpp1*) et de l'enzyme productrice de l'adénosine (*nt5e*) sont retrouvés dans le système vasculaire, en particulier *nt5e* est exprimé



spécifiquement dans la veine cardinale commune reliant le cœur au rein (**tableau 5**). Chez *Xenopus laevis*, l'administration d'antagonistes des récepteurs adora au stade 31 provoque des défauts au niveau de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse [311]. De même, chez le poulet, l'activation des récepteurs adora par l'administration d'adénosine entraîne des défauts dans le développement vasculaire [309]. Ces résultats montrent que l'adénosine serait impliquée dans le développement du système vasculaire et que la présence de la cd73 (codée par *nt5e*) dans la veine cardinale commune pourrait permettre sa production.

L'obtention de cette carte d'expression spatio-temporelle est très importante pour deux raisons majeures. D'une part, elle permet de comparer les profils d'expression des gènes permettant de réguler la concentration extracellulaire de l'ATP, ADP et adénosine et d'appréhender les rôles de ces purines au cours de l'embryogénèse. De plus, elle permet de démontrer que la voie de signalisation purinergique et notamment celle de l'adénosine est impliquée dans la physiologie de nombreux organes, mais également lors de leur mise en place.

D'autre part, cette étude est une étape nécessaire aux études fonctionnelles car elle permet d'établir quelle protéine pourrait être impliquée dans un tissu donné. Cette étude m'a permis de sélectionner l'enzyme phosphatase alpl afin d'établir ses fonctions au cours de la formation du rein et de l'œil. En effet, ses deux organes sont des sites majeurs d'expression des acteurs de la voie de signalisation purinergique mais notamment celle de l'adénosine. Chaque acteur de la voie de signalisation de l'adénosine est présent en au moins un exemplaire (**tableau 5**). Nous avons déjà démontré l'implication de deux ectonucléotidases dans la formation de l'œil et du rein ([403] et Massé *et al.*, en révision, voir annexe II). L'enzyme alpl étant spécifiquement exprimée dans ces deux tissus, il nous était donc possible, via son étude fonctionnelle, d'apporter de nouvelles évidences quant à l'importance des ectonucléotidases lors de la formation de ces deux tissus.



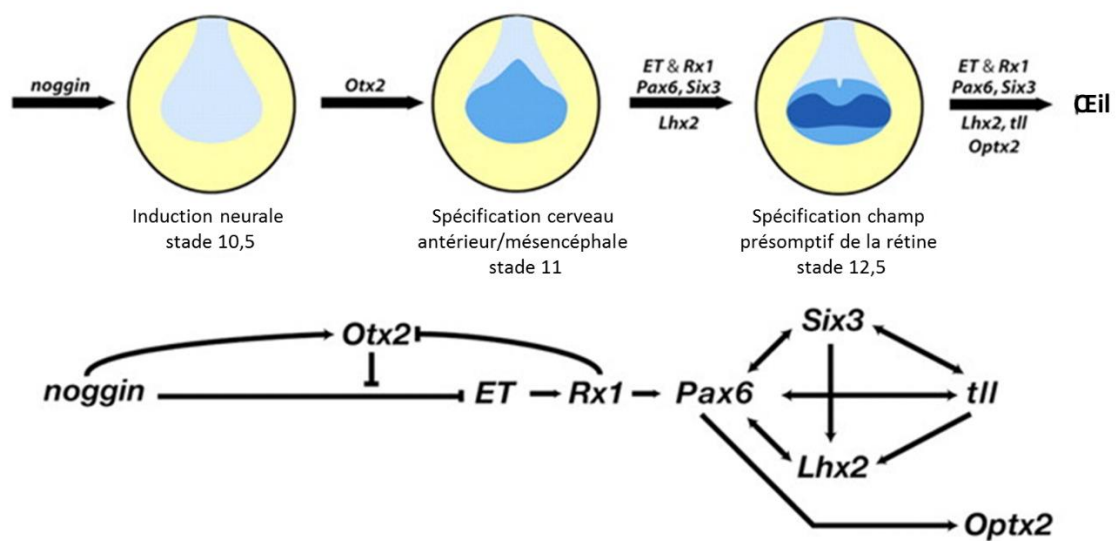


Figure 75: **Modèle d'induction du champ présomptif de la rétine dans la plaque neurale antérieure.** Le bleu clair indique la plaque neurale, le bleu montre l'expression d'Otx2 et le bleu foncé représente le champ présomptif de l'œil. D'après [416] .

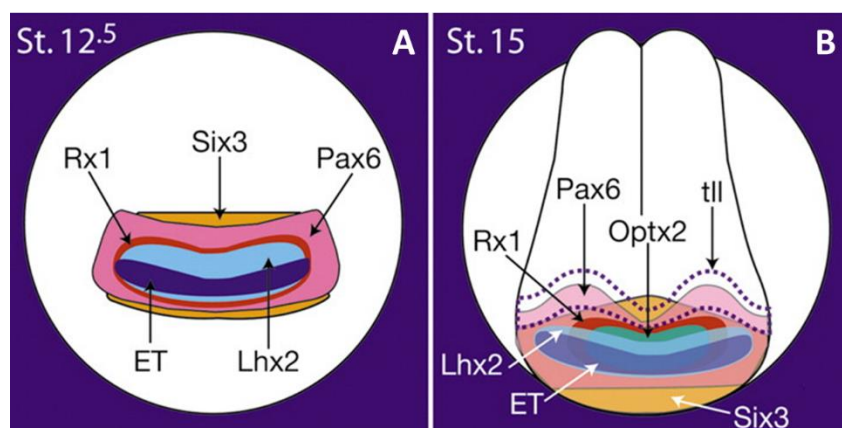


Figure 76: **Schéma résumant le profil d'expression des facteurs de transcription EFTFs aux stades 12,5 (A) et 15 (B).** D'après [416].

# Deuxième partie

## Etude de la phosphatase alcaline alpl

### I- Introduction

Dans la première partie de ma thèse, nous avons caractérisé le profil d'expression de la phosphatase alcaline non tissu-spécifique au cours du développement du xénope. Son expression au niveau de l'œil et du rein de l'embryon a attiré notre attention. **Quel est le rôle de la phosphatase alcaline au cours du développement de l'œil et du rein ?**

#### A. Développement de l'œil chez *Xenopus laevis*

Comme nous avons vu précédemment, le xénope est un modèle adapté pour étudier les voies de signalisation ou protéines impliquées dans la formation de l'œil. L'œil devient fonctionnel à la fin de l'organogenèse mais la formation de la rétine et du cristallin débute au cours de la gastrulation.

##### 1. Spécification de la rétine

La première étape du développement de l'œil est la spécification de la rétine. Elle permet la mise en place du champ présomptif de la rétine par une série d'induction progressive dès la gastrulation (**figure 75**).

L'expression du gène *noggin* permet la conversion de l'ectoderme dorsal en plaque neurale au stade 10,5. Puis, la spécification de la région antérieure de la plaque neurale en cerveau antérieur/mésencéphale a lieu rapidement par induction du gène *otx2* [424]. Dès le début de la neurulation (stade 12,5), ce dernier va potentialiser l'expression des facteurs de transcription EFTFs pour « Eye Field Transcription Factors » dans le champ présomptif de la rétine situé à l'intérieur de la région antérieure de la plaque neurale (**figure 76**). Ce réseau génique est composé des gènes *ET* (ou *tbx3*), *Rx1* (ou *Rax*), *Pax6*, *Six3*, *Lhx2*, *tll* et *Optx2* (ou *Six6*). La surexpression de *Pax6*, *Rx1*, *Six3* ou *Optx2* est suffisante pour induire la formation d'un œil dans le système nerveux des vertébrés [425-428]. A l'inverse, une mutation de *PAX6*, *SIX3* et *OPTX2* chez l'humain entraîne des malformations au niveau des yeux [429]. Une mutation ciblée ou spontanée des gènes *Pax6*, *Rx1*, *Lhx2*, *Six3* et *Optx2* chez la souris entraîne des anomalies oculaires, voire une absence totale d'œil [401, 430-433]. Chez *Xenopus laevis*, l'isolation du champ présomptif de l'œil au stade 12,5 en présence du mésoderme sous-jacent, entraîne la formation de deux rétines [434]. Le gène *ET* est positionné en amont du circuit et induit l'expression de *Rx1*, *Lhx2* et *tll*, qui à leur tour induisent l'expression de *Pax6/Lhx2/tll/Optx2*, *Pax6* et *Pax6/Six3/Lhx2* respectivement (**figure 75**) [416].

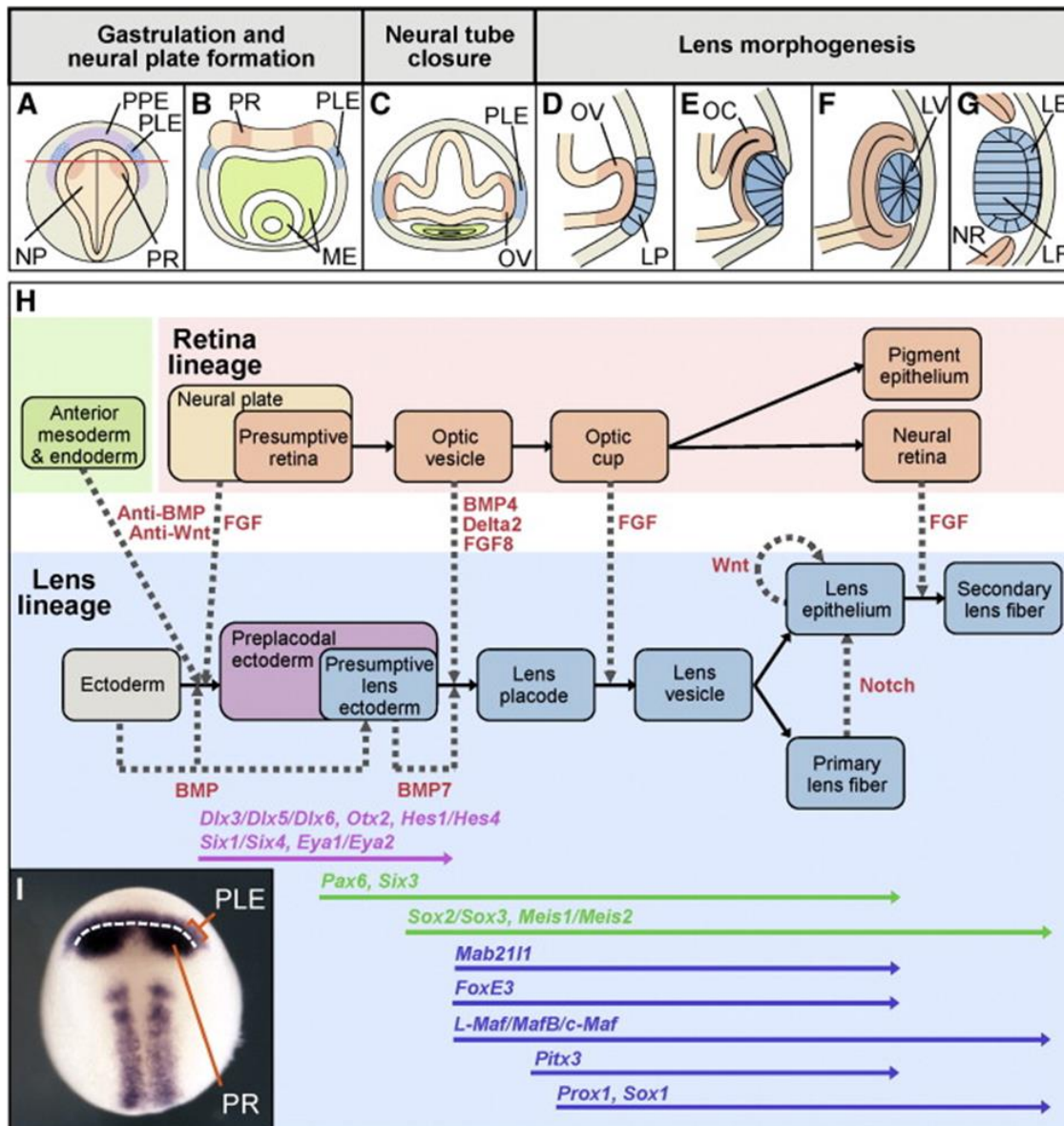


Figure 77: **Illustration schématique du développement du cristallin chez le xénope.** (A-G) Les stades de développement sont indiqués au-dessus de chaque figure. Les cercles rouges représentent les zones d'expression de l'*alpl.a*, détectée par hybridation *in situ*. (A) Vue dorsale d'un embryon au stade plaque neurale (côté antérieur en haut). L'ectoderme préplacodal (PPE) est indiqué en violet et le champ présomptif du cristallin en points bleus (PLE). La plaque neurale est colorée en jaune (NP) et le champ présomptif de la rétine en orange (PR). (B) Section transversale d'un embryon stade plaque neurale à travers le PLE et le PR. Le plan de coupe est indiqué en rouge dans la figure A. (B-G) Les lignées du cristallin et de la rétine sont indiqués respectivement en bleu et en orange et le mésoderme-endoderme est indiqué en vert (ME). (C) Section transversale d'un embryon au stade tube neural. Les vésicules optiques (OV) issues du PR ont rejoint le PLE. (D-F) Gros plans de la formation de la vésicule du cristallin. Le PLE en contact avec les OV s'épaissit pour former la placode du cristallin (LP). Elle est entourée de coupes optiques (OC) et se sépare de l'ectoderme pour former les vésicules du cristallin (LV). (G) Gros plan du cristallin en maturation. LE : épithélium du cristallin ; LF : fibres du cristallin ; NR : rétine neurale. (H) Les facteurs d'induction majeurs sont indiqués en rouge sur les flèches en pointillés gris. FGF provenant de la rétine neurale est responsable de la formation des fibres secondaires du cristallin à partir de l'épithélium du cristallin. Les autres voies de signalisation sont détaillées dans le texte. Le profil d'expression des gènes pré-placodaux, de spécification et de différenciation du cristallin sont indiqués par les flèches rose, verte et bleu respectivement. (I) Analyse de l'expression de Pax6 par hybridation *in situ* sur un embryon de stade plaque neurale (vue dorsale). Le PLE et PR sont indiqués. La limite entre la plaque neurale et le PPE est indiquée par les pointillés blancs. D'après [435].

## 2. Spécification du cristallin

En parallèle, la spécification du cristallin a lieu dans l'ectoderme préplacodal (PPE), adjacent à la plaque neurale antérieure [436]. Cette zone exprime des gènes pré-placodaux (**figure 77**) grâce à l'induction de signaux horizontaux venant de la plaque neurale (*via* FGF) et verticaux venant de l'endomesoderme antérieur (*via* anti-BMP et anti-Wnt). Puis, le facteur BMP, issu de l'ectoderme va induire l'expression de gènes de spécification du cristallin comme *pax6* et *six3* (**figure 77**), entraînant l'apparition de la zone potentielle de formation du cristallin ou le champ présomptif du cristallin (PLE).

## 3. Différenciation de l'œil

Le champ présomptif de la rétine subit une expansion bilatérale pour former les vésicules optiques (ou *retina primordium*) qui vont entrer en contact avec le champ présomptif du cristallin (PLE) (**figure 77**). La différenciation de la rétine et du cristallin débute alors. Les vésicules optiques vont stimuler la différenciation du PLE en placodes du cristallin (*via* BMP4, Delta2, FGF8) en activant l'expression des gènes de différenciation du cristallin comme *pitx3* (**figure 77**). Ces vésicules vont s'invaginer autour des placodes du cristallin afin de former les coupes optiques. Ces dernières vont, à leur tour, induire la différenciation des placodes en vésicules du cristallin *via* le FGF. Pour finir, les coupes optiques vont se différencier en deux couches cellulaires : l'épithélium rétinien pigmenté à l'extérieur et la rétine neurale à l'intérieur. Les vésicules du cristallin vont, quant à elles, se différencier en fibres primaires et secondaires à l'intérieur et en épithélium à l'extérieur.

## 4. Rétinogenèse

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la rétine fonctionnelle est composée de plusieurs couches cellulaires différenciées, mais également d'une zone marginale ciliaire constituée de cellules en prolifération. Cette zone est le lieu de la rétinogenèse. Elle se déroule dès la différenciation de la rétine et tout au long de la vie chez le xénope. Une cascade génétique hiérarchique très complexe, correspondant au gradient temporel permet la différenciation des cellules souches en rétino blastes, puis en précurseurs indifférenciés et différenciés (**figure 51 et 78**). Les nombreux gènes exprimés dans les différentes cellules de la rétine sont présentés dans la **figure 78**.

Les cellules souches, dans la région la plus périphérique de la rétine expriment uniquement les gènes précoces *six3*, *rx1* et *pax6*. Le gène *pax6* contrôle l'état multipotent des cellules souches rétiniennes puisque chez un mutant *Pax6* conditionnel, seules des cellules amacrine dérivent des cellules progénitrices [377]. Les rétino blastes expriment également ces gènes mais expriment aussi *x-delta-1*, *notch-1*, *esr1*, *esr3*, *ash1* et *ash3*. Les cellules au stade précurseur indifférencié expriment tous les gènes précédents, mais également *ath-3*, *ath5*, *myt1*, *neuroD* et *otx2*. Les cellules précurseurs post-

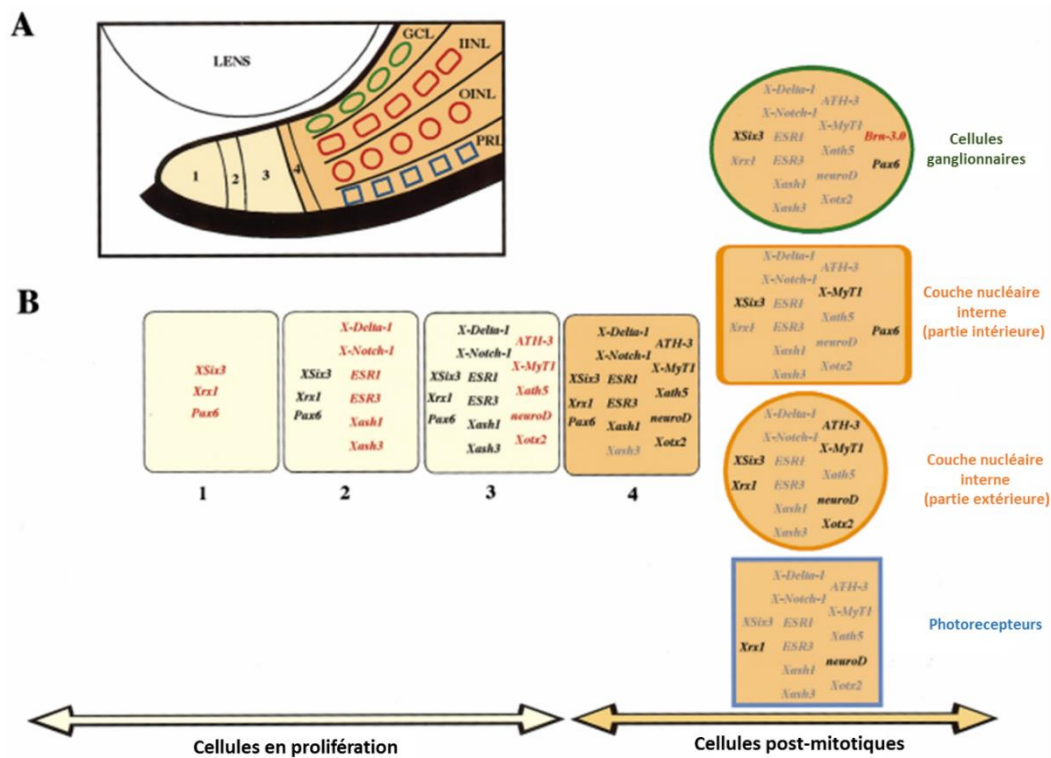


Figure 78: **Reconstruction de la cascade génétique au cours de la rétino-genèse.** (A) La zone marginale ciliaire (CMZ) est subdivisée en quatre zones, notée 1, 2, 3 et 4, et les cellules de la rétine centrale sont schématisées avec différentes formes pour chaque couche. Les régions contenant des cellules en division sont colorées en jaune alors que les régions contenant des cellules post-mitotiques sont colorées en orange. GCL : couche de cellules ganglionnaires ; IINL : partie intérieure de la couche nucléaire interne ; OINL : partie extérieure de la couche nucléaire interne ; PRL : couche des photorécepteurs. (B) L'expression des gènes dans les cellules des quatre zones de la CMZ (1, 2, 3 et 4) est présentée. Les cellules de la rétine centrale sont représentées par le même code couleur que A. Les gènes qui apparaissent pour la première fois sont en rouge, les gènes qui sont exprimés dans le stade précédent sont en noir et les gènes qui ne sont plus exprimés mais qui l'étaient dans le stade précédent sont barrés en gris. 1 : cellules souches ; 2 : rétino-blastes ; 3 : progéniteurs indifférenciés et 4 : progéniteurs différenciés. D'après [437].

mitotiques expriment exactement les mêmes gènes que les cellules du stade précédent (excepté *ash3*). Ces cellules reçoivent également des signaux des cellules différenciées de la rétine centrale, afin de maintenir ou d'induire différentes combinaisons de gènes en fonction du type de couche rétinienne auquel elle donne naissance. Ces cellules possèdent également des combinaisons de gènes différentes (**figure 78**). Les voies de signalisation Notch, Wnt, FGF et Hedgehog (Hh) sont actives au niveau de la CMZ et sont impliquées, de manière distincte mais interactive, dans la maintenance, la prolifération et la différenciation des cellules souches et progénitrices [438]. La voie Hh contrôle la longueur du cycle cellulaire, et influencerait la transition des cellules souches en cellules progénitrices [439]. A l'opposé, la voie Wnt, provenant des cellules différenciées de la rétine, est impliquée dans la maintenance du pool de cellules souches rétinienne [440]. Ces voies de signalisation agissent sous forme de morphogènes produits dans des territoires rétiniens différents et s'inhibent mutuellement [441].

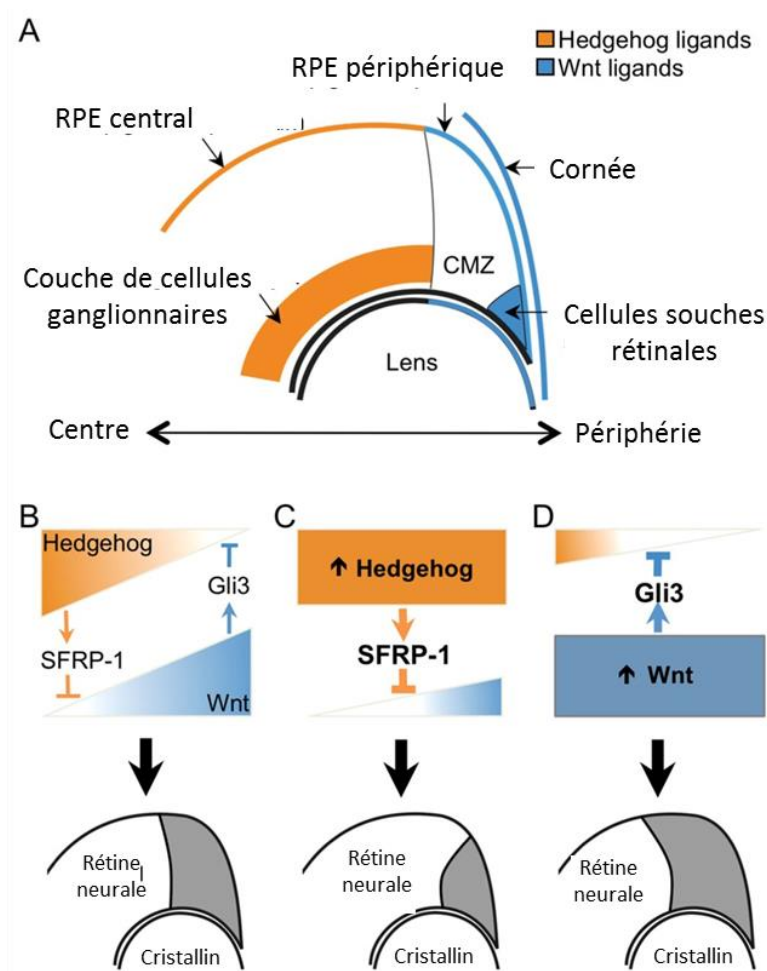


Figure 79 : **Modèle d'interactions entre Wnt et Hedgehog dans la rétine post-mitotique.** (A) Schéma d'exclusivité mutuelle des domaines d'expression des ligands de Wnt et Hedgehog le long de l'axe centre/périphérie de la rétine post-embryonnaire. (B-D) Illustration des activités des voies Wnt et Hedgehog dans la niche neurogénique rétinale et des interactions possibles permettant leur régulation négative mutuelle. Le cas physiologique est représenté en B et les expériences d'activation d'Hedgehog et Wnt en C et D respectivement. L'impact opposé sur la prolifération des cellules souches et progénitrices est représenté par les changements de la population des cellules prolifératives de la CMZ (en gris). D'après [441].



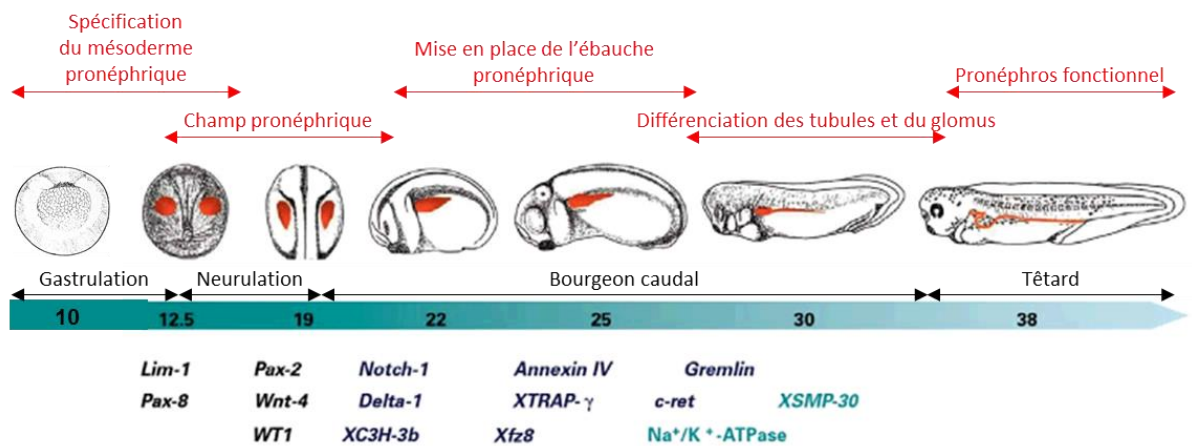


Figure 80: **Expression séquentielle des gènes dans le développement du pronephros de *Xenopus laevis*.** Les différentes étapes de mise en place du pronephros sont indiquées en rouge. Les régions en rouge représentent le tissu pronephrique. La flèche centrale représente les différents stades embryonnaires. Les gènes indiqués en noir, bleu foncé et vert sont ceux exprimés successivement au cours de la formation du rein. D'après [442].

## **B. Développement du rein chez *Xenopus laevis* – la néphrogenèse**

Chez le xénope, le rein embryonnaire fonctionnel correspond au pronéphros, constitué d'un seul néphron (**figure 46**). Le rein embryonnaire devient fonctionnel à la fin de l'organogenèse, mais sa mise en place débute lors de la gastrulation (**figure 80**).

### **1. Spécification du mésoderme pronephrique**

Le mésoderme pronephrique présomptif est mis en place au cours de la gastrulation (**figure 80**). Ce tissu va se spécifier dès le début de la neurulation pour former le champ pronephrique. Cette zone est constituée de l'ensemble des cellules mésodermiques intermédiaires co-exprimant les gènes *pax8* et *lhx1* (ou *lim1*) [443]. Ces deux gènes constituent les marqueurs les plus précoces du champ pronephrique. Les différentes régions pronephriques sont toutefois spécifiées à des stades différents, soit dès le début de la neurulation (stade 12.5) en ce qui concerne les tubules proximaux et le glomérule, soit un peu plus tardivement dans la neurulation (stades 13/14) pour les tubules distaux [444].

La régionalisation du mésoderme fait intervenir le métabolisme de l'acide rétinoïque (AR), un métabolite de la vitamine A [445]. La signalisation de l'AR agirait directement sur la transcription du gène *lhx1* (ou *lim1*) et est nécessaire à la spécification du mésoderme pronephrique [446]. L'inhibition de la signalisation du FGF est nécessaire pour une expression normale des gènes *pax8* et *lhx1* dans le champ pronephrique. Cette inhibition ferait également intervenir la voie de l'acide rétinoïque [447]. Des données récentes montrent que l'effet inhibiteur de la voie FGF sur le développement pronephrique n'est pas due à une inhibition directe de la voie de l'acide rétinoïque [448]. En fait, ces deux voies interagissent au niveau de la protéine mkp3 (mitogen-activated protein kinase phosphatase-3) et ferait intervenir la voie de signalisation Erk.

La formation des somites antérieures est également requise pour la mise en place du pronephros, car la spécification du mésoderme pronephrique serait due à un signal provenant du mésoderme dorsal [449, 450] *via* la signalisation Wnt [451].

### **2. Morphogenèse de l'ébauche pronephrique**

Au cours de la fermeture du tube neural, le mésoderme latéral se subdivise en deux couches: la couche médiane (ou splanchnopleure) et la couche latérale (ou somatopleure) par l'intermédiaire de la signalisation Wnt. La première est à l'origine du glomus et la seconde des tubules. Le gène *WT1* est activé dans la couche médiane et inhiberait l'expression des gènes *pax8* et *lhx1*, impliqués dans la formation des tubules [452]. Ces deux couches vont par la suite se scinder pour former la cavité coelomique (ou le néphrocœle) qui séparera le glomus des tubules.



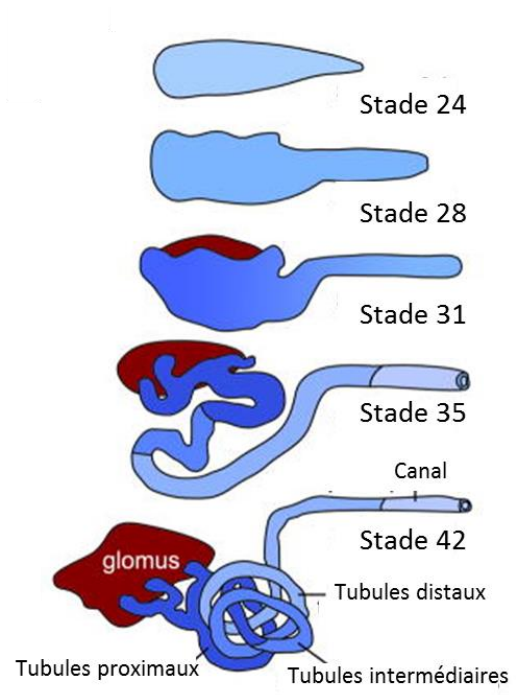


Figure 81 : **Schéma du développement du pronéphros** à partir du stade 24 (ébauche du pronéphros) jusqu'au stade 42 où il est totalement différencié. Les couleurs représentent la différenciation progressive des cellules et des différents segments du pronéphros. D'après [374].

Au stade 20, l'ébauche du pronéphros devient morphologiquement distinguable. Elle constitue un léger épaissement de la couche latérale au niveau des somites n°3 à 5. Les cellules de l'ébauche pronéphrique se condensent de plus en plus et progressent vers la partie postérieure, jusqu'au stade 27 (**figure 80**). La condensation de l'ébauche débute par l'intervention des voies de signalisation Wnt [453] et FGF [454]. Puis, l'ectoderme juxtaposé à l'ébauche pronéphrique intervient dans le maintien de l'identité rénale par l'intermédiaire de la voie BMP [455].

La couche latérale de l'ébauche pronéphrique va ensuite se polariser selon l'axe antéro-postérieur par l'intervention de la voie de signalisation Notch (*Notch-1*, *Delta-1* et *X-Serrate-1*). Cette voie stimulerait la différenciation des futurs tubules proximaux (région dorsale-antérieure) et inhiberait la formation des futurs tubules distaux et du canal (région ventrale-postérieure) [456]. La mise en place du pronéphros le long de l'axe medio-latéral est aussi sous la dépendance de la voie de signalisation Notch [457]. Cette voie de signalisation, en activant Wnt4, permet la séparation puis le développement des futurs glomérule et tubules proximaux.

### 3. Différenciation du néphron

Après cette étape, les tubules vont se recouvrir d'épithélium et les podocytes vont se différencier au niveau du glomus.

A partir du stade 27, le canal ou tubule collecteur débute une différenciation progressive vers la partie antérieure. Le gène *gremlin* est exprimé dans les tubules distaux et le canal et participerait à l'inhibition de la signalisation BMP dans ces cellules et à leur différenciation [458]. La transition des cellules du pronephros de leur forme mésenchymateuse à un état épithélialisé et polarisé ferait intervenir la voie Wnt (*Wnt-4* et *Xfz8*) [459, 460]. Entre les stades 28 et 30, les cellules s'organisent radialement, ce qui entraîne l'apparition de la lumière des tubules.

Les trois néphrostomes se différencient et des cils se forment au niveau de la membrane apicale de leurs cellules. Ils deviennent potentiellement fonctionnels à partir du stade 33/34, mais la vascularisation du glomus ne se met en place qu'à partir du stade 35/36 par la colonisation de capillaires dérivés de l'aorte dorsale *via* la molécule VEGF [461]. Le glomus et la cavité coelomique augmentent de volume et dans la partie terminale du pronéphros, le tubule collecteur va fusionner avec le diverticule rectal et connecte ainsi le pronéphros au milieu extérieur. Le rein devient alors fonctionnel à partir du stade 37/38 (**figure 81**).

Chez *Xenopus laevis*, le rein adulte est le mésonephros (**figure 47**). Les premières cellules mésonephriques apparaissent dans la région caudale dès le stade 39. Le pronéphros commence à dégénérer au stade 53 (métamorphose) en même temps que le mésonephros devient fonctionnel. Au stade 64, le pronéphros a complètement disparu [442].



## II- Résultats

Les données expérimentales acquises au cours de la deuxième partie de ma thèse sont présentées ici sous forme d'une ébauche d'article scientifique, suivi de résultats préliminaires et des perspectives.

L'article débute par la caractérisation *in silico* des deux homéologues *alpl.a* et *alpl.b*. Une étude phylogénique et génomique montrent l'orthologie des protéines de *Xenopus laevis* avec celles des mammifères. Puis, nous présentons le profil d'expression d'*alpl.a* obtenu par hybridation *in situ* montrant la spécificité d'expression de ce gène dans le rein et la rétine de l'embryon de xénope. Enfin, des analyses fonctionnelles incluant différents marqueurs rénaux et oculaires montrent que l'*alpl* est impliquée dans le développement de ces deux tissus au cours de l'embryogenèse. Les références de l'article sont compilées avec celles de la thèse, mais la numérotation des figures (Figure) est propre à l'article.

Les perspectives regroupent des résultats préliminaires et les expériences envisagées pour compléter ce travail et permettre la publication d'un deuxième article scientifique.



**A. Article**

**Alpl.a is involved in eye and kidney formation in *Xenopus*.**

Alice Tocco<sup>1,2</sup>, Camille Cosse<sup>1</sup>, Sandrine Fédou<sup>1,2</sup>, Pierre Thiébaud<sup>1,2</sup>, Nadine Thézé<sup>1,2</sup>, Karine Massé<sup>1,2, \*</sup>

<sup>1</sup>University of Bordeaux, CIRID UMR 5164, F-33000, Bordeaux, France.

<sup>2</sup>CNRS, CIRID, UMR 5164, F-33000 Bordeaux, France

\* corresponding author

[karine.masse@u-bordeaux.fr](mailto:karine.masse@u-bordeaux.fr)

Phone: +33 (0)557579266

Fax: +33 (0)557571472



## Introduction

Alkaline phosphatases (AP) are ecto-enzymes, fixed at the external leaflet of the membrane by a phosphatidylinositol glycan (GPI) anchor and are therefore able to phosphorylate substrates located in the extracellular space. These enzymes are present in a variety of species, in bacteria, archaea, invertebrates and vertebrates but not in plants [24]. The intense study of *E.coli* AP, in particular its crystal structure resolution, has brought the first evidences in the catalytic mechanism comprehension of this enzyme [462]. Since, crystal structures of other bacterial, shrimp and human AP have been obtained, enabling the understanding of the protein properties and residues mutations physiological effects [24]. These enzymes are more often homodimeric proteins and each catalytic site contains three metal ions (two zinc and one magnesium) that are necessary for catalytic activity [95, 462]. These phosphatases display broad substrate specificity towards a wide variety of phosphate compounds and different phosphomonoesters.

Alkaline phosphatases are encoded by a multigene family and are named after the tissue they are predominantly expressed. In human, four genes have been identified and can be distinguished into two groups based on their expression profile and genome localization [463]. The tissue non-specific (*TNAP* or *L/B/K AP*) alkaline phosphatase gene (*ALPL*) is located on chromosome 1 and displays a wide expression profile with a higher expression in adult kidney, liver and bone. The other three genes show a more restricted expression profile and are clustered on chromosome 2. The *ALPP*, *ALPP2* and *ALPI* encode the tissue specific placental (PLAP), the germ cell (GCAP) and the intestinal (IAP) alkaline phosphatases. The AP number and specificity varies between species. In mice, five genes have been identified but the human gene molecular characteristics are conserved. The mouse *ALPL* ortholog gene (*akp2*) is located on the chromosome 4 whereas the mouse *ALPI* genes (*akp3* and *akp6*) are closely located to mouse *akp5* gene (related to both human *ALPP* and *ALPP2* genes) and the pseudo-gene *akp-ps*. In rats, so far one *Alpl* gene has been cloned located on chromosome 5 and two genes encoding IAP proteins (*Alpi* and *Akp3*) and two encoding PLAP (*Alpp* and *Alpp2*) have been identified on chromosome 9 [464]. Therefore, so far, only one gene coding for *ALPL* per specie has been identified and the EAP/GCAP+PLAP encoding genes are only found in mammals.

The importance of AP in vertebrate physiology has been demonstrated by human hypophosphatasia studies. This rare and autosomal heritable disorder characterized by defective bone and tooth mineralization results from a deficiency in *ALPL*, the only human pathology linked to an AP deficiency. Six clinical forms are currently recognised based on age at diagnosis and severity of features [465]. The most severe forms are the perinatal and infantine hypophosphatasia, which leads in most cases in death *in utero*, postnatal or within the first months after birth. In this disorder, three phosphocompounds (phosphoethanolamine (PEA), pyridoxal 5'-phosphate (PLP) and inorganic

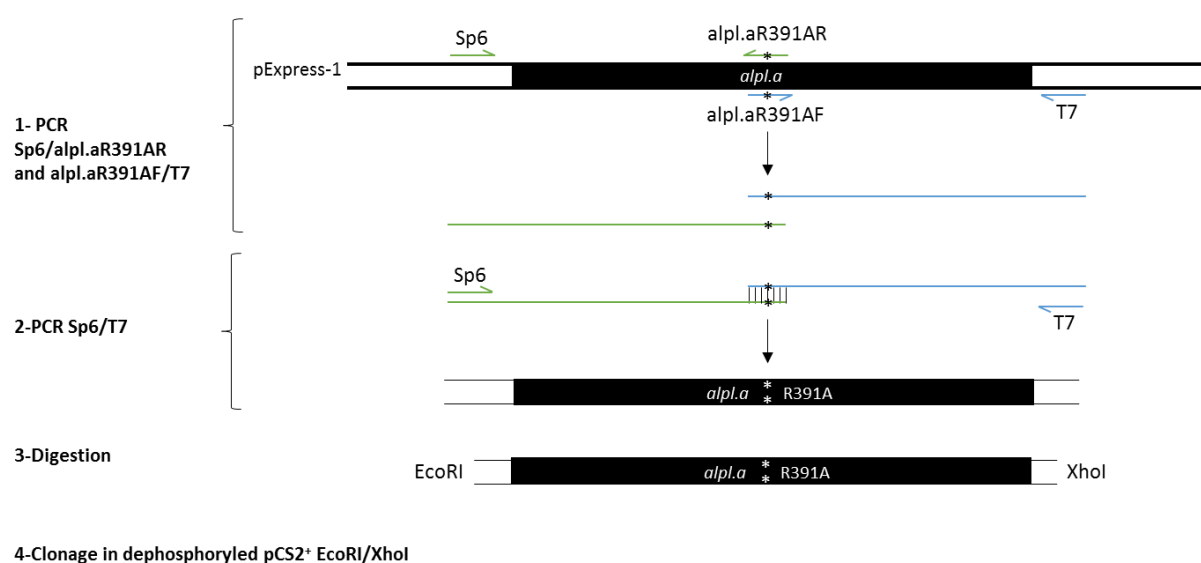




pyrophosphate (PPi)) accumulate and seem to be the natural ALPL substrates. The generation of null mice has provided animal models for the infantile or adult form of hypophosphatasia and helped towards the understanding of ALPL mechanisms [423, 466, 467]. Although the absence of ALPL is not lethal for embryonic development, the mutant mice die from seizures due to the elevated serum PLP levels resulting in reduced GABA levels in the brain whereas the skeletal alterations are linked to the accumulation of the other ALPL substrate, the mineralization inhibitor PPi [117, 468]. ALPL enzymes belong to the large family of ectonucleotidases, key regulators of the purinergic signalling pathway [24, 35]. By sequentially hydrolysing ATP into adenosine, TNAP activity can inactivate P2 and activate P1 receptors signalling. Although its implication within this pathway has been proved *in vitro*, mostly in neuronal cells, little is known regarding the physiological ALPL involvement in purinergic signalling *in vivo* [469, 470].

In mammals, only two AP are expressed during embryogenesis [303]. Although, EAP is predominant during preimplantation development, Alpl is the only AP expressed from E7. *Alpl* transcripts are first detected in specific regions of the embryo but at E14, expression is widespread, in developing skeletal system, primordial germ cells within the embryonic gonad, intestine, placenta [466]. Strong AP activity is also detected in the rodent neuronal tissues, suggesting potential roles during neurogenesis [131, 471]. Immunohistochemistry studies confirmed the localization of Alpl in murine neurogenic zones, placing this enzyme as a novel marker for subsets progenitors in adult and embryonic brain [128]. However, the implication of ALPL enzyme during embryogenesis remains unclear.

In a recent comparative study of the embryonic expression profile of the adenosine signalling pathway members, we reported the identification of *Xenopus alpl* gene [418]. Here we identify a second *X.laevis alpl* gene that we named *alpl.b* as opposed to *alpl.a*, the previously described gene. Protein sequence, phylogenetic and synteny analyses confirm their high level of conservation during vertebrate evolution. Indeed, *alpl.a* displays an alkaline phosphatase activity. We analysed the expression profile of *alpl.a* by *in situ* hybridization and demonstrate its high expression in the pronephric proximal tubules and the retina ciliary marginal zone. *Alpl.a* knockdown leads to the formation of a smaller eye and the strong reduction of eye markers at late, but not at early, stages of eye development. *Alpl.a* depletion also induces the formation of smaller kidney or the loss of any pronephric structures, with the proximal and intermediate tubules being the most affected segments. These demonstrate that *alpl.a* is necessary for both pronephric and retina development.



**Figure 1: Schematic representation of the cloning strategy of the alpl.aR391A mutant.** The alpl.a-R391A was generated through two successive rounds of PCR. The first round of PCR using the following primers couples (alpl.aR391AF and T7 primer) and (alpl.aR391AR and Sp6 primer) allowed the amplification of two fragments containing the desired mutation indicated with an asterisk (1) and the second round the amplification of full-length *alpl-R391A* sequence using the T7 and Sp6 primers (2). After digestion by *EcoRI* and *XhoI*, this final PCR product (3) was inserted into the pCS2<sup>+</sup> vector (4).

## Materiel and Methods

### *Ethics Statement*

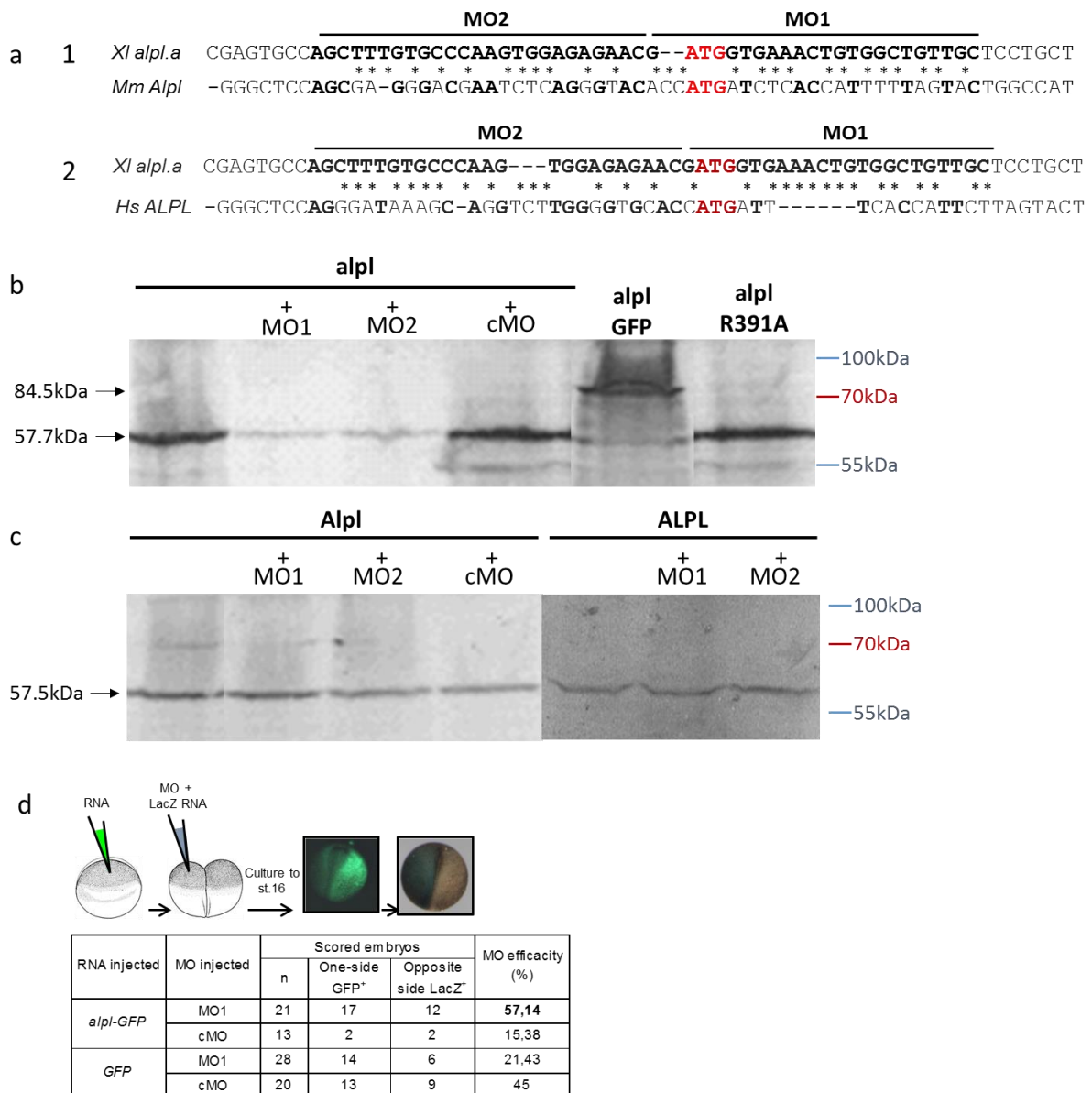
This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the European Community. The protocol was approved by the “Comité d’éthique en experimentation de Bordeaux” Nu33011005-A.

### *Bioinformatics*

Genomic *X.laevis alpl.b* sequence was identified by a BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) search on the Xenbase website using *X.laevis* 7.1 Scaffolds. Pairwise alignments were performed using the Needle program and multiple alignments using the software ClustalW2 on the EMBL-EBI website. The phylogenetic tree was built on the Phylogeny.fr platform. Synteny analyses were performed using the Metazome v3.0 and Ensembl. Conceptual translation of nucleotide sequences and protein sequence analysis were performed on the ExPaSy website. Splice junctions were verified according to the Breathnach and Chambon law [472].

### *Alpl.a cloning and Site directed mutagenesis*

Site directed mutagenesis of *Xenopus alpl.a* or *alpl.a*-GFP in frame fusion was achieved by PCR using the Phusion Taq (New England Biolabs) and the *alpl.a*-pExpress1 plasmid as template (IMAGE clone: 7977142) (**Figure 1**). The 5'UTR and full coding region (minus stop codon) of *alpl.a* was amplified using the forward (5'-CGTGAATTCAGCTTTGTGCCCAAGTGG-3') and reverse (5'-ATACCTCGAGGATAGAAGAGCTGGAGG-3') primers. The PCR product was inserted into the pCS2<sup>+</sup>-GFP after digestion by *EcoRI* and *XhoI*, whose sites are underlined in the primer sequences. The *alpl.a*-R391A was generated through two successive rounds of PCR. The first round of PCR using the following primers couples (5'-TTACACTCATG**CCCG**GAAACCCAA-3' and T7 primer) and (5'-AGATTGGGTTTCC**GGC**ATGAGTGT-3' and Sp6 primer) allowed the amplification of two fragments containing the desired mutation indicated in bold in the primer sequences and the second round the amplification of full-length *alpl*-R391A sequence using the T7 and Sp6 primers. After digestion by *EcoRI* and *XhoI*, this final PCR product was inserted into the pCS2<sup>+</sup> vector. The resulting constructs were validated by sequencing.



**Figure 2: Alpl.a MO1 and MO2 specificity and efficiency.** (a) Alignment of the 5'UTR of *Xenopus* (XI), mouse (Mm) and human (Hs) *alpl* sequences and position of *alpl.a* MO1 and MO2 in relation to *Xenopus alpl.a* cDNA. The ATG is indicated in red and the MO sequences are indicated in bold. The asterisks indicate the unconserved nucleotides over the MO sequences. Only 13 nucleotides over the whole *alpl.a* MO2 sequence are conserved in *Alpl* or *ALPL* cDNA. The sequences over the whole *alpl.a* MO1 are less conserved, with only 8 and 10 conserved bases in human and mouse cDNA respectively. Autoradiography of a 12% SDS PAGE gel of *in vitro* translated <sup>35</sup>S-Methionine radiolabelled *Xenopus* (b) and mammal (c) *alpl* proteins. Translation of *Xenopus alpl.a* mRNA (0.5µg) produced a protein of 57 kDa. Its translation was severely affected by the addition of (0.4µg) of MO1 or MO2 but unaffected by the control MO (cMO). Translation of *Xenopus alpl.a*-GFP and *alpl.a*R391A mRNAs produced a protein at the expected molecular size. Translation of mouse *Alpl* or human *ALPL* mRNAs produced a protein of 57 kDa. Their translation was unaffected by the addition of (0.4µg) of MO1 or MO2 or MOc. (d) *In vivo* efficacy of the *alpl.a* MO1. *Xenopus* embryos were injected with the *alpl.a*-GFP or GFP mRNAs at one cell stage followed by unilateral injections of *alpl.a* MO1 or control MO (cMO) in presence of *LacZ* mRNA at 2-cell stage. GFP<sup>+</sup> fluorescent positive embryos were sorted at stage 16 and stained for β-galactosidase activity. The numbers of embryos GFP<sup>+</sup> on one side and LacZ<sup>+</sup> on the opposite side and the percentage of efficiency of the MO1 and cMO to inhibit the translation of the different mRNAs are indicated in the table.

### ***mRNA synthesis and morpholino oligonucleotides***

Capped mRNAs were synthesized *in vitro* using mMESSAGE mMACHINE Sp6 and T7 Kits (Ambion) from linearized plasmids *alpl.a*-pExpress-1, *alpl.a*-GFP-pCS2<sup>+</sup>, *alpl.a*R391A-pCS2<sup>+</sup>, *Alpl*-pcDNA3 (Image clone 6807509), ALPL-pCMVScript6 (kind gift of Dr. Millan). *Alpl.a* MO1 (5'-GATGGTGAAACTGTGGCTGTTG-3') and *alpl.a* MO2 (5'-AGCTTTGTGCCCAAGTGGAGAGAAC-3') and random control (cMO) were designed and supplied by GeneTools, LLC. The position of the MOs in relation to the *alpl.a* cDNA is indicated in **Figure 2a**.

### ***Embryo culture, microinjections and lineage staining***

Embryos were produced by *in vitro* fertilisation by standard procedures, dejellied in 2% L-cysteine hydrochloride pH7.8 and washed several times with 0,1x MMR. Embryos were then cultured to the required stage in 0,1xMMR in presence of 10µg/ml of gentamycin. The embryos were staged according to Nieuwkoop and Faber, 1994. *Xenopus* embryos were injected at one cell stage or into one blastomere at stage 2-cell for the MO efficiency and for AP activity tests. Targeted microinjections were performed into one blastomere at stage 4-cell. The animal dorsal blastomere was injected for targeting the eye and the vegetal ventral blastomere for targeting the kidney. Either *LacZ* or *GFP* (250 pg) RNA was co-injected as lineage tracer. Injected embryos were cultured to various developmental stages, fixed in MEMFA and stained for beta-galactosidase activity by Red-Gal or X-Gal staining to identify the injected side and correctly targeted embryos.

### ***In vitro translation of construct mRNA***

mRNA (0,5µg) was translated *in vitro* in the Rabbit Reticulocyte Lysate System (Promega) according to manufacturer's protocol in presence of 10µCi of [<sup>35</sup>S]-Methionine alone or with MO. Translation products were analysed by autoradiography after an overnight exposure of the 12% SDS polyacrylamide gel.

### ***Alkaline phosphatase activity staining***

Embryos fixed in MEMFA were dehydrated in methanol and kept at least overnight at -20°C. After rehydration in PBS, embryos were washed into the AP buffer (0,1 M Tris pH9.5, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 M NaCl, 0,1% Tween-20) and incubated with the NBT/BCIP AP substrate (Roche).

### ***Analysis of molecular marker expression***

Whole-mount immunohistochemistry was performed using monoclonal 12/101, 3G8 and 4A6 antibodies as previously described [473, 474]. *In situ* hybridization was carried out using a standard protocol [475]. Each probe was labelled with digoxigenin using the DIG RNA labelling kit (Roche) and

		n	% phenotype injected eye				Chi2 test with cMO
			No phenotype	Smaller	Absent	Anormal	
Pax6 stage 37/38 N=2	cMO	75	50,7	22,7	0,0	26,7	
	MO1	81	35,8	63,0	0,0	1,2	2,24.10-8
	MO2	84	20,2	58,3	3,6	17,9	2,48.10-6
Rx1 stage 35/36 N=2	cMO	45	66,7	6,7	0,0	26,7	
	MO1	52	23,1	53,8	0,0	23,1	1,06.10-6
	MO2	39	33,3	30,8	0,0	35,9	0,0025
Pitx3 stage 35/36 N=2	cMO	50	48,0	46,0	6,0	0,0	
	MO1	44	36,4	63,6	0,0	0,0	0,09
	MO2	36	13,9	75,0	11,1	0,0	0,003

			n	% phenotype injected side						Chi2 test with cMO
				No phenotype	Bigger	Smaller	Absent	Missing part	Thinner	
3G8/4A6 stage 41 N=2	Proximal tubules (PT)	cMO	44	79,5	0,0	20,5	0,0	0,0	0,0	
		MO1	48	45,8	4,2	47,9	2,1	0,0	0,0	0,002
		MO2	68	22,1	0,0	69,1	8,8	0,0	0,0	2,56.10-9
	Intermediate tubules (IT)	cMO	44	72,7	2,3	25,0	0,0	0,0	0,0	
		MO1	48	52,1	0,0	43,8	4,1	0,0	0,0	0,04
		MO2	68	20,6	1,5	44,1	33,8	0,0	0,0	2,8.10-9
	Distal + collector tubules (DT + CT)	cMO	44	84,1	0,0	9,1	6,8	0,0	0,0	
		MO1	48	70,8	0,0	10,4	18,8	0,0	0,0	0,2 (Fisher)
		MO2	68	47,0	0,0	22,1	30,9	0,0	0,0	0,00036
ATPase stage 35/36 N=2	Proximal tubules (PT)	cMO	53	79,2	1,9	18,9	0,0	0,0	0,0	
		MO1	28	46,4	10,7	42,9	0,0	0,0	0,0	0,0065 (Fisher)
		MO2	62	32,3	3,2	37,1	27,4	0,0	0,0	7,8.10-8
	Intermediate tubules (IT)	cMO	53	81,1	7,6	11,3	0,0	0,0	0,0	
		MO1	28	57,2	7,1	35,7	0,0	0,0	0,0	0,02 (Fisher)
		MO2	62	32,3	3,2	30,6	33,9	0,0	0,0	1,56.10-9
	Distal + collector tubules (DT + CT)	cMO	53	92,4	0,0	0,0	0,0	3,8	3,8	
		MO1	28	50,0	0,0	0,0	3,6	3,6	42,8	4,46.10-6
		MO2	62	38,7	0,0	0,0	25,8	21,0	14,5	1,32.10-9
Pax8 stage 27/28 N=2	Proximal tubules (PT)	cMO	38	65,8	0,0	34,2	0,0	0,0	0,0	
		MO1	66	48,5	27,3	15,1	9,1	0,0	0,0	4,04.10-5
		MO2	49	34,7	59,2	2,0	4,1	0,0	0,0	8,3.10-12
	Intermediate + distal + collector tubules (IT + DT + CT)	cMO	38	86,8	7,9	5,3	0,0	0,0	0,0	
		MO1	66	62,1	16,7	9,1	12,1	0,0	0,0	0,03
		MO2	49	36,7	57,2	2,0	4,1	0,0	0,0	5,6.10-7

		n	% phenotype somite		Chi2 test with cMO
			No phenotype	Anormal	
12/101 stage 41 N=2	cMO	41	87,8	12,2	
	MO1	49	65,3	34,7	0,013
	MO2	58	15,5	84,5	1,11.10-12
ATPase stage 35/36 N=2	cMO	53	81,1	18,9	
	MO1	27	78,6	21,4	0,7
	MO2	62	11,3	88,7	5,03.10-14

**Table 1: Scoring analysis of *alpl.a* misexpression (related to figure 7, 8 and 9).** (a) Eye phenotypes analysis with *pax6*, *rx1* and *pitx3* markers. (b) Kidney phenotypes analysis with 3G8/4A6 antibody, and *Na+K+-ATPase* and *pax8* markers. (c) Somite phenotypes analysis with 12/101 antibody and *Na+K+-ATPase* marker. Phenotypes were scored and statistical Chi2 test or Fischer test was performed to compare MO1 or MO2 phenotypes with cMO ones. Significant difference is indicated in grey

**Table 2 (see next page): Scoring analysis of *alpl.a* misexpression to confirm.** (a) Eye phenotype analysis with *cyclin D1* and *c-myc* markers (related to Figure 13). (b) Eye phenotypes analysis with *pax6* marker. Statistical Fisher test was performed to compare MO1 or MO2 phenotypes with cMO ones. (c) Kidney phenotypes analysis with *pax8* marker (related to Figure 14a). (d) Mesoderm phenotypes analysis with *xbra* marker (related to Figure 14b). Statistical Chi2 test was performed to compare MO1 or MO2 phenotypes with cMO ones. Significant difference is indicated in grey.

the hybridization was visualised using sheep anti-DIG-alkaline phosphatase antibody (Roche) and BM purple substrate (Roche). After fixation overnight in Bouin's fixative, non-specific staining was removed by several washes in 70% ethanol/PBS and embryos were bleached following standard procedures. 0.33 kb of *alpl.a* 3'-UTR of the *alpl.a*-pExpress-1 clone was subcloned by PCR into the vector pBlueScripKS; the antisense probe was transcribed *in vitro* with T3 RNA polymerase and the sense with T7 RNA polymerase from this plasmid linearised respectively by *Bam*HI and *Xho*I. The *Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase*, *pax8*, *pax6*, *rax*, *pitx3* probes were generated as described previously [403, 457, 476, 477].

### ***Embryos embedding, sectioning and histology staining***

*Alpl.a* stained embryos were either embedded in agarose and vibratome sectioned at 50µm or OCT embedded before cryostat sectioning at 18µm. Fixed MO injected embryos were dehydrated, xylene washed and embedded in paraffin before microtome sectioning at 12µm. Transverse head sections were then hematoxylin-eosin stained following standard protocol. Slides were finally dehydrated and after xylene washes mounted. Sections were photographed with a magnification of x40.

### ***Statistical analysis***

All experiments were repeated several times and pronephric and eye phenotypes were determined by comparing the injected and uninjected sides. Only embryos that had normal kidney or eye formation on the uninjected side and corrected targeting on the injected side were scored. All raw data and statistical analyses are presented in the **Table 1 and 2**.

		n	% phenotype injected eye				
			No phenotype	Larger	Smaller	Deformed	Absent
Cyclin D1 stage 41 N=1	cMO	29	72,4	10,4	0,0	17,2	0,0
	MO1	39	38,4	25,7	0,0	33,3	2,6
	MO2	14	14,3	0,0	21,4	50,0	14,3
C-myc stage 41 N=1	cMO	27	81,5	3,7	3,7	11,1	0,0
	MO1	43	48,8	4,7	11,6	30,2	4,7
	MO2	19	36,8	0,0	31,6	15,8	15,8

			n	% phenotype injected eye		Fisher test with cMO
				No phenotype	Smaller	
Pax 6 N=2	Stage 16	cMO	16	81,2	18,8	0,2
		MO1	44	65,9	34,1	
	Stage 23	cMO	19	68,4	31,6	0,15
		MO1	45	48,9	51,1	

		n	% phenotype injected side		
			No phenotype	Less marked	Absent
Pax8 stage 13 N=1	cMO	14	71,4	14,3	14,3
	MO2	16	17,6	11,8	70,6

		n	% phenotype injected side		Chi2 test with cMO
			No phenotype	Less marked	
Xbra stage 10,5 N=2	cMO	47	66,0	34,0	0,1
	MO2	47	80,9	19,1	

**Table 2:** legend in previous page



	Xl alpl.a	Xl alpl.b	Xt alpl	Hs ALPL	Mm Alpl	Gl Alpl	Dr alpl
Xl alpl.a	100						
Xl alpl.b	92	100					
Xt alpl	91,7	90,4	100				
Hs ALPL	71,6	71,8	74,3	100			
Mm Alpl	72,1	72,3	73,8	89,9	100		
Gl Alpl	71,5	70,3	71,3	74,6	75,1	100	
Dr alpl	70,9	70,1	74,3	71,6	70	68,6	100

**Table 3: Identity conservation between *Xenopus* alpl proteins and their vertebrate orthologs.** The percentage of amino acid identity between proteins was determined by pairwise alignment using ClustalW2 software on the EMBL-EBI Internet site. The accession numbers of the different proteins are given in **Figure 3**. D.r, *Danio rerio*; G.g, *Gallus gallus*; H.s, *Homo sapiens*; M.m, *Mus musculus*; X.l, *Xenopus laevis*; X.t, *Xenopus tropicalis*.

Xl alpl.a	MVKIWLILLIGTSLSEVTEPEPEENENYWRROAQETFLMNAIQ-LQNLNTNVAKNVIMFLDGMGVFTVTAAIRILKGGQAGQPGEEETOLEM
Xl alpl.b	MVKIGVILLICTSLTETPEPEENENYWRROAQETFLMNAIQ-LQNLNTNVAKNVIMFLDGMGVFTVTAAIRILKGGQAGQPGEEETOLEM
Xt alpl	MVKIWLILLIGTSLSEVTEPEPEENENYWRROAQETFLMNAIQ-LQNLNTNVAKNVIMFLDGMGVFTVTAAIRILKGGQAGQPGEEETOLEM
HALPL	MISPFVLAIGTCLTNSLVPKPKEDPKYWRDQAQETLKYALE-LQKLNTNVAKNVIMFLDGMGVFTVTAAIRILKGGQAGQPGEEETOLEM
MaAlpl	MISPFVLAIGTCLTNSFVPEKERDEPSYWRROAQETFLMNAIQ-LQKLNTNVAKNVIMFLDGMGVFTVTAAIRILKGGQAGQPGEEETOLEM
Xl alpl.a	DKFFHVALSKTYNTNAQVPDSAGTATAYLCGVKANEGTVGVAAAVRNCNTSKGNEVDSIMWAKQAGKSVGVVTTTRNHATPSAAYA
Xl alpl.b	DKFFHVALSKTYNTNAQVPDSAGTATAYLCGVKANEGTVGVAAAVRNCNTSKGNEVDSIMWAKQAGKSVGVVTTTRNHATPSAAYA
Xt alpl	DKFFHVALSKTYNTNAQVPDSAGTATAYLCGVKANEGTVGVAAAVRNCNTSKGNEVDSIMWAKQAGKSVGVVTTTRNHATPSAAYA
HALPL	DKFFHVALSKTYNTNAQVPDSAGTATAYLCGVKANEGTVGVSAATERSRNCNTSKGNEVDSIMWAKQAGKSVGVVTTTRNHATPSAAYA
MaAlpl	DKFFHVALSKTYNTNAQVPDSAGTATAYLCGVKANEGTVGVSAATERFRNCNTSKGNEVDSIMWAKQAGKSVGVVTTTRNHATPSAAYA
Xl alpl.a	HCVMRDWYSDQEMPEEAQOGCKDIAQLMHNINIEVIMGGGRKYMFEKNTSDVEYFNDKSSGTRLDGLNLFQIWDGKPNKKAARYV
Xl alpl.b	HCVMRDWYSDLEMPPEEAQOGCKDIAQLMHNINIEVIMGGGRKYMFEKNTSDVEYFNDKSSGTRLDGLNLFQIWDGKPNKKAARYV
Xt alpl	HCVMRDWYSDLEMPPEEAQOGCKDIAQLMHNINIEVIMGGGRKYMFEKNTSDVEYFNDKSSGTRLDGLNLFQIWDGKPNKKAARYV
HALPL	HSADRWDYSDNEMPEEALSOGCKDIAQLMHNIRIDVIMGGGRKYMFEKNTSDVEYFNDKSSGTRLDGLNLFQIWDGKPNKKAARYV
MaAlpl	HSADRWDYSDNEMPEEALSOGCKDIAQLMHNIRIDVIMGGGRKYMFEKNTSDVEYFNDKSSGTRLDGLNLFQIWDGKPNKKAARYV
Xl alpl.a	WNRECLLSVNPQEVVDHLLGLFEPDMYELERNNTDPSLSEMVVAALRIILTKNLKGFLLVEGGRIDHGHHGKAKQALHEAVQMDIAI
Xl alpl.b	WNRECLLSVNPQEVVDHLLGLFEPDMYELERNNTDPSLSEMVVAALRIILTKNLKGFLLVEGGRIDHGHHGKAKQALHEAVQMDIAI
Xt alpl	WNRECLLSVNPQEVVDHLLGLFEPDMYELERNNTDPSLSEMVVAALRIILTKNLKGFLLVEGGRIDHGHHGKAKQALHEAVQMDIAI
HALPL	WNRECLLSVNPQEVVDHLLGLFEPDMYELERNNTDPSLSEMVVAALRIILTKNLKGFLLVEGGRIDHGHHGKAKQALHEAVQMDIAI
MaAlpl	WNRECLLSVNPQEVVDHLLGLFEPDMYELERNNTDPSLSEMVVAALRIILTKNLKGFLLVEGGRIDHGHHGKAKQALHEAVQMDIAI
Xl alpl.a	GVSCNNTSVVDTLTVVTADHSHVFTFGGYTHRCNPTFGLAFVPSDVKPFTIILYNGNGPGYKVVGGRENVSVVDVSHENYLAQSAVPL
Xl alpl.b	GVSCNNTSVVDTLTVVTADHSHVFTFGGYTHRCNPTFGLAFVPSDVKPFTIILYNGNGPGYKVVGGRENVSVVDVSHENYLAQSAVPL
Xt alpl	GLAGSVTSEVDTLTVVTADHSHVFTFGGYTHRCNPTFGLAFVPSDVKPFTIILYNGNGPGYKVVGGRENVSVVDVSHENYLAQSAVPL
HALPL	GOAGSVTSSVDTLTVVTADHSHVFTFGGYTHRCNPTFGLAFVPSDVKPFTIILYNGNGPGYKVVGGRENVSVVDVSHENYLAQSAVPL
MaAlpl	GKAGSVTSSVDTLTVVTADHSHVFTFGGYTHRCNPTFGLAFVPSDVKPFTIILYNGNGPGYKVVGGRENVSVVDVSHENYLAQSAVPL
Xl alpl.a	RMETHGGEDVAVFKGPMALLHGVHEQNYPHVMAYAICIGNQDHCTSGKGNNGARTSLILSVLLPFLSLQLFY 526
Xl alpl.b	RMETHGGEDVAVFKGPMALLHGVHEQNYPHVMAYAICIGNQDHCTSSRGNDGARTSLILSVLLPFLSLQLFY 526
Xt alpl	RMETHGGEDVAVFKGPMALLHGVHEQNYPHVMAYAICIGNQDHCTSSRGNDGARTSLILSVLLPFLSLQLFY (436)
HALPL	RMETHGGEDVAVFKGPMALLHGVHEQNYPHVMAYAICIGANLGHCAPASSAGSLAAGPILALADYPLSVLF 524
MaAlpl	RMETHGGEDVAVFKGPMALLHGVHEQNYPHVMAYAICIGANLGHCAWAGSGSAPSPGAILPLAVLSLRTLF 524

**Figure 3: Identification of *Xenopus* alpl homeologs by sequence comparison and phylogeny analyses. A. Protein sequence alignment of *Xenopus* alpl enzymes.** The *X.laevis* (Xl), *X.tropicalis* (Xt) proteins were aligned with their human (H) and mouse (M) orthologs using CLUSTALW2 software on the EMBL-EBI Website. Residues conserved in all sequences are indicated by a black background. Residues conserved only in the three *Xenopus* sequences are indicated by a dark grey background. Residues conserved only in *X.laevis* sequences are indicated with a light grey background. Residues conserved between either *X.laevis* alpl.a or alpl.b and at least one of the orthologues are indicated by a blue or green background respectively. The crown domain is indicated by the grey box. The calcium binding domain is underlined. The active sites are indicated by an asterisk. The putative N-glycosylation sites are indicated by a blue bracket. The amino acid R391 mutated in this study is indicated by the red hash symbol. Spaces in the sequences are indicated by a dash. The size of the proteins (AA numbers), complete or incomplete (in bracket) are also given.

## Results

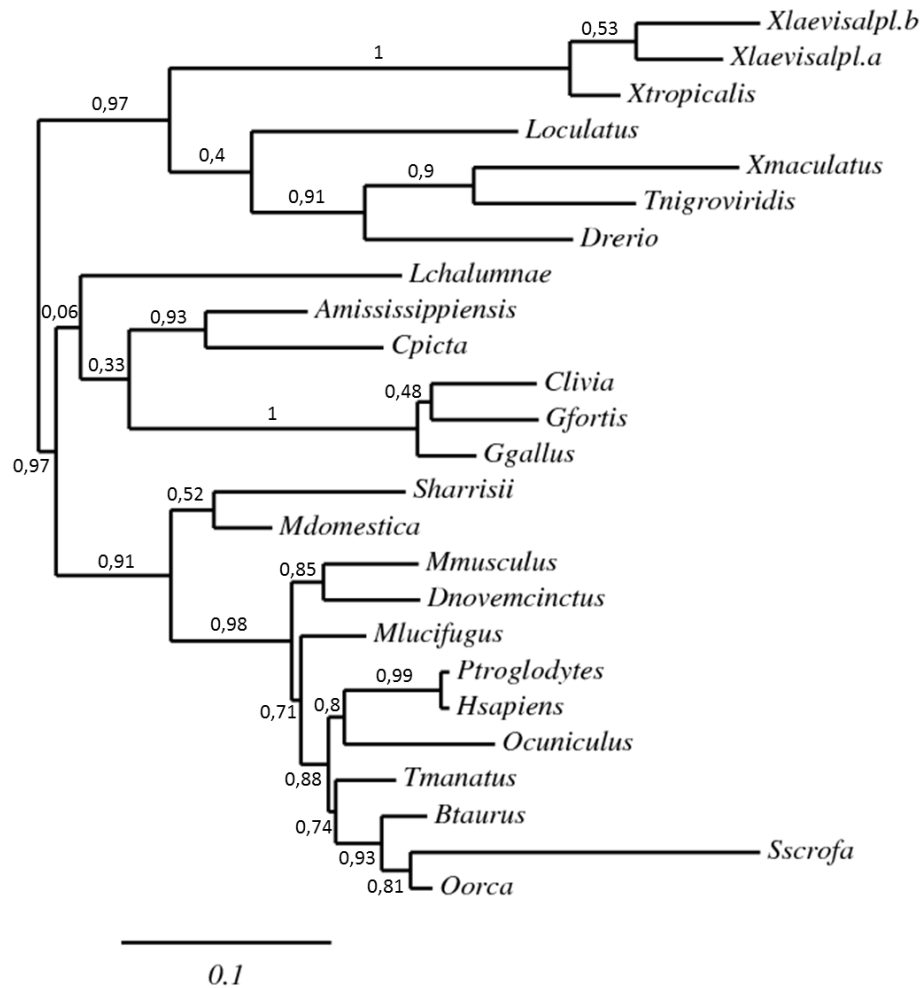
### Cloning of the *X.laevis alpl.b* gene

We previously reported the identification of *X.laevis alpl* gene located on scaffold 57316 [418]. A novel sequence was identified by BLAST on the genomic *X.laevis* 7.1 Scaffolds databases (Xenbase website). This novel gene, located on scaffold 36295, encodes a 526 amino acids long protein as the previous identified *alpl* gene. These two proteins show 92% of identity with only 38 amino acids difference (**Figure 3; Table 3**). Moreover, both proteins share more than 90% and 71% of identity with the *X.tropicalis* *alpl* and human ALPL proteins (**Table 3**). Furthermore, both of these *X.laevis* sequences have similar identity percentage with the mouse, chick and zebrafish *alpl* identified sequences (**Table 3**). These data suggest that this novel gene is the conserved duplicated *alpl* gene, arisen from the *X.laevis* genome polyploidization event. According to the nomenclature gene guidelines, we tagged these homeologs with .a and .b, the suffix .a being allocated to the previous identified sequence [418].

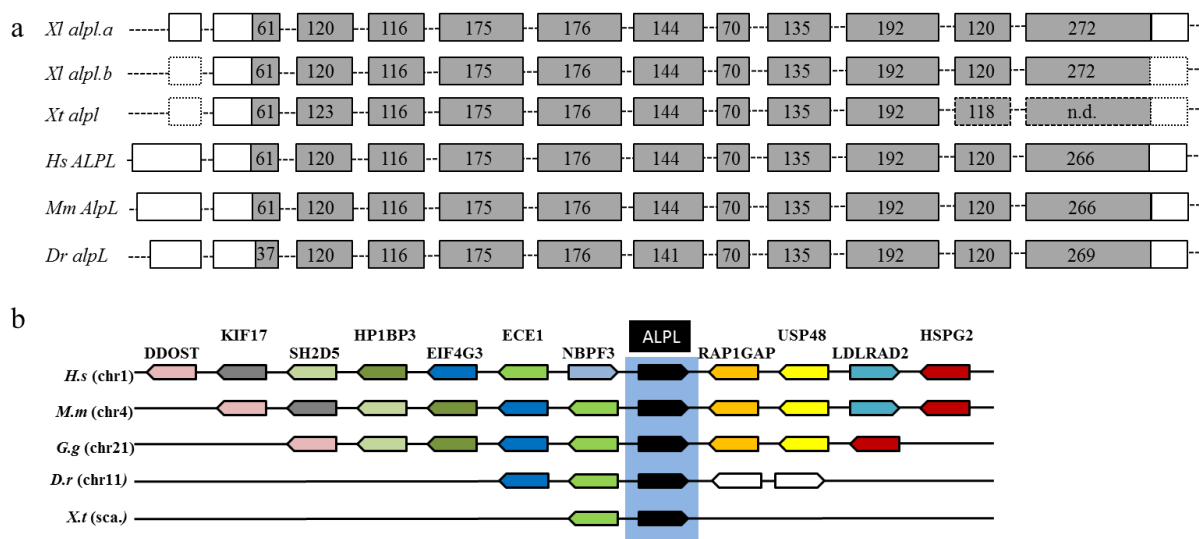
### Synteny and phylogenetic analysis of the *alpl* family

As shown in **Figure 3a**, the three *Xenopus* protein are highly similar, with only 55 amino acids differences. Among them, 21 are amino acids differences between the *X.laevis* homeologs and their *X.tropicalis* orthologs. To analyse the conservation of the *alpl* proteins during vertebrate evolution, a phylogenetic tree was constructed using the available full-length sequence of various *alpl* proteins from all classes of jawed vertebrates (**Figure 3b**). This shows a clear separation between the fish and amphibian *alpl* proteins and *alpl* enzymes from reptile, aves and mammalia classes with the *alpl* coelacanth more related to its reptiles and mammals than to its fish orthologs.

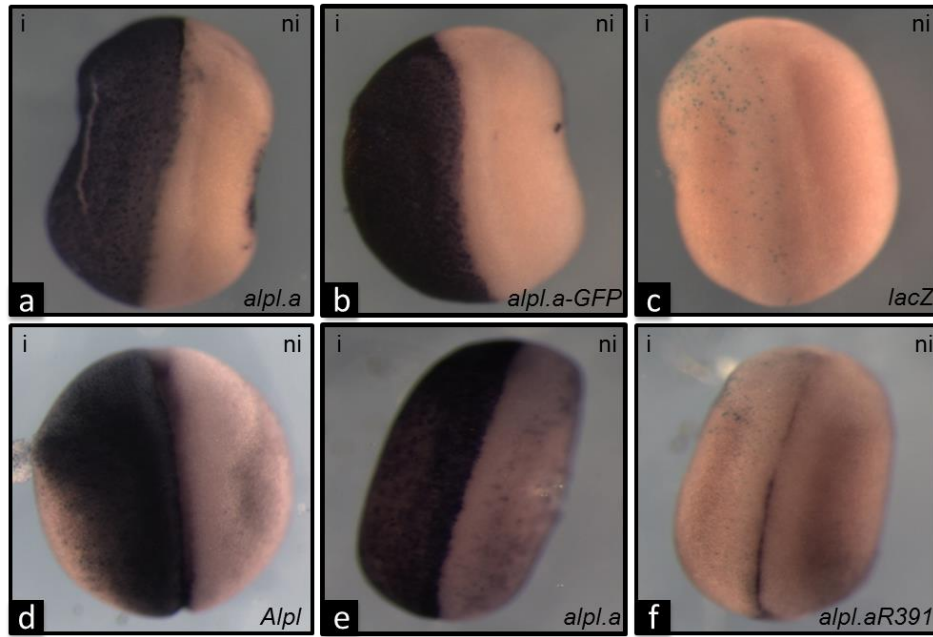
The conservation of the *alpl* genes in the vertebrate lineage was further analysed by gene structure analysis (**Figure 4a**). *Xenopus*, human, mouse and zebrafish genes have an identical structure, with 11 exons, although the first one, only composed of untranslated sequences cannot be identified for *X.laevis alpl.b* gene, due to incomplete genome sequencing. The coding region is split into ten exons and the size of exons 3 to 10 has been conserved during evolution, except for exon 7 of zebrafish and exon 3 of *X.tropicalis* genes. We confirmed the evolution of the *alpl* genes in the vertebrate lineage by synteny analysis (**Figure 4b**). As shown in **Figure 4b**, there is a high level of conservation between human, mouse and chick genome regions. We have found indication of a similar synteny for *alpl* of the zebrafish and *X.tropicalis*, although there is little information about these genomic regions in databases.



(continuation Figure 3) **B. Phylogenetic tree of the vertebrate alpl proteins.** A phylogenetic tree was constructed on the Phylogeny.fr platform. A cluster algorithm was used to build the tree. Likelihood ratio is indicated at each node of the tree. The GenBank and Ensembl accession numbers of ALPL proteins are as follows: *Xlaevisalpl.a*: NP\_001080895; *Xlaevisalpl.b*: (to be submitted); *Xtropicalis*: XP\_002943485; *Loculatus*: ENSLOCT00000004111; *Xmaculatus*: ENSXMAT00000017743; *Tnigroviridis*: ENSTNIT000000015366; *Drerio*: XP\_005169330; *Lchalumnae*: XP\_005988748; *Amississippiensis*: XP\_006261757; *Cpicta*: XP\_005281771; *Clivia*: XP\_005514585; *Gfortis*: XP\_005428288; *Ggallus*: NP\_990691; *Sharrisii*: XP\_003764958; *Mdomestica*: XP\_007491291; *Mmusculus*: NP\_001274101; *Dnovemcinctus*: ENSDNOT00000009450; *Mlucifugus*: XP\_006094076; *Ptroglydotes*: XP\_003307915; *Hsapiens*: NP\_000469; *Ocuniculus*: XP\_008263955; *Tmanatus*: XP\_004377214; *Btaurus*: NP\_789828; *Sscrofa*: XP\_005658515; *Oorca*: XP\_004272548; *Amississippiensis*: *Alligator mississippiensis*; *Btaurus*: *Bos Taurus*; *Clivia*: *Columba livia*; *Cpicta*: *Chrysemys picta bellii*; *Dnovemcinctus*: *Dasypus novemcinctus*; *Drerio*, *Danio rerio*; *Gfortis*: *Geospiza fortis*; *Ggallus*: *Gallus gallus*; *Hsapiens*: *Homo sapiens*; *Lchalumnae*: *Latimeria chalumnae*; *Loculatus*: *Lepisosteus oculatus*; *Mdomestica*: *Monodelphis domestica*; *Mlucifugus*: *Myotis lucifugus*; *Mmusculus*: *Mus musculus*; *Ocuniculus*: *Oryctolagus cuniculus*; *Oorca*: *Orcinus orca*; *Ptroglydotes*: *Pan troglodytes*; *Sharrisii*: *Sarcophilus harrisii*; *Sscrofa*: *Sus scrofa*; *Tmanatus*: *Trichechus manatus latirostris*; *Tnigroviridis*: *Tetraodon nigroviridis*; *Xlaevis*: *Xenopus laevis*; *Xmaculatus*: *Xiphophorus maculatus*; *Xtropicalis*: *Xenopus tropicalis*.



**Figure 4: Conservative evolution of the *tissue non-specific alkaline phosphatase (ALPL)* genes.** **A.** Schematic representation of *alpl* genes from zebrafish (*Dr*), human (*Hs*), mouse (*Mm*), *Xenopus laevis* (*Xl*) and *Xenopus tropicalis* (*Xt*). Coding exons are indicated by a grey background, UTR sequences by an open box and the unidentified exons by a dashed box. The exon 10 of *X.tropicalis* gene is incomplete in its 3' end. Introns are figures by a dashed line. Numbers inside exons correspond to the size in nucleotides of the coding regions. The genes are not on scale for simplicity. **B.** The synteny map for the *alpl* genes was generated by comparison of human (*Hs*), mouse (*Mm*), chicken (*Gg*), zebrafish (*Dr*) and *X.tropicalis* (*Xt*) chromosome regions containing *alpl* gene. The NCBI GeneID of *ALPL* genes are as follows: *ALPL*-*H.s*: 249; *Alpl*-*M.m*: 11647; *alpl*-*G.g*: 396317; *alpl*-*D.r*: 393982. Each conserved gene is color coded; the unconserved genes are indicated by white boxes. The arrow indicates the orientation of the transcription unit on the different chromosome (chr) or scaffold (sca). *D.r*, *Danio rerio*; *G.g*, *Gallus gallus*; *H.s*, *Homo sapiens*; *M.m*, *Mus musculus*; *X.l*, *Xenopus laevis*; *X.t*, *Xenopus tropicalis*.



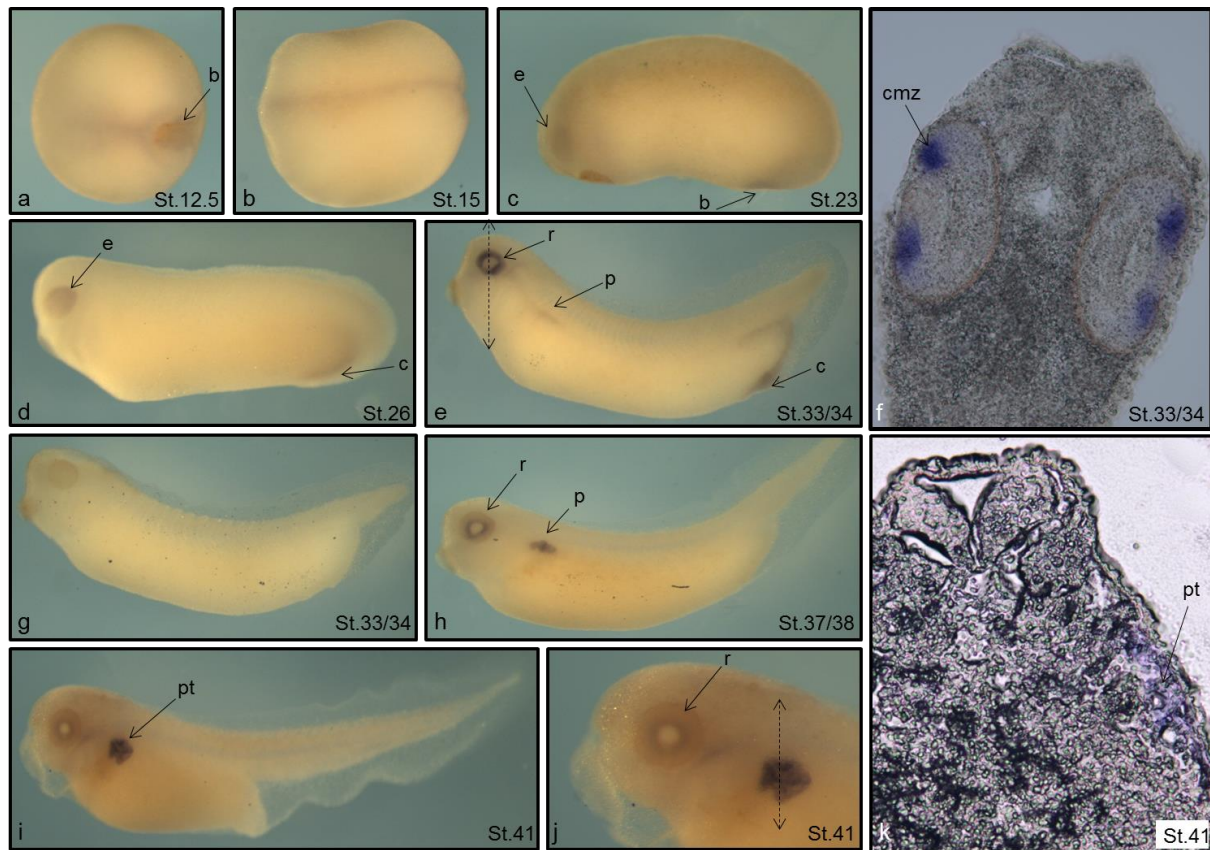
**Figure 5. Alkaline phosphatase (AP) activity of alpl proteins.** *X.laavis* embryos injected with 5 ng of *alpl.a* (a, e), *alpl.a-GFP* (b), *Alpl* (d), *alpl.aR391A* (f) and 250 pg of *LacZ* mRNA or with 250 pg of *LacZ* mRNA (c) into one blastomere at stage 2-cell embryos were fixed at late neurula stages and stained for X-Gal (blue) and for AP enzyme (dark purple) activity. The length of the AP activity staining for (e) and (f) was increased to detect any potential staining following the mutant mRNA injection. Dorsal region is up. i: injected side; ni: non injected side.

### **X.laevis alpl display alpl enzymatic activity**

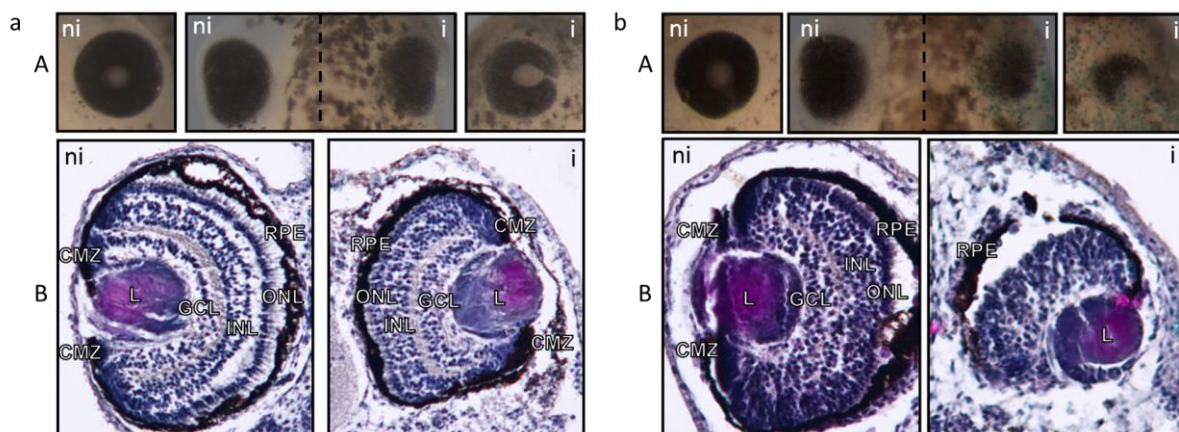
The three *Xenopus* sequences are highly similar to the other vertebrate alpl enzymes and have 70,1 to 74,3% sequence identity with other vertebrate orthologs (**Table 3**). Bioinformatics analysis shows that, as the human ALPL, *Xenopus* proteins have one transmembrane domain located at the C terminal and one cleavable signal peptide in the N terminal region (1-18). As shown in **Figure 3**, the three *Xenopus* alpl proteins display the features of the tissue non-specific alkaline phosphatases [478]. The active sites and neighboring residues involved in protein function are conserved in all three amphibian sequences [478]. The crown domain, which is a characteristic of mammalian alpl is also well conserved in *Xenopus* sequences, with 75,4% of identity between *X.laevis* alpl.a or alpl.b with human or mouse sequences. Among the 65 amino acids forming this domain, 17 are not conserved in *X.laevis* alpl.a whereas the S<sup>394</sup> is conserved in *X.laevis* alpl.b. Interestingly, H<sup>451</sup>, involved in substrate binding is not present in both *X.laevis* proteins [478]. The six residues (D<sup>109</sup>, E<sup>125</sup>, G<sup>126</sup>, R<sup>184</sup>, Y<sup>187</sup> and Y<sup>388</sup>) forming the ionic pocket, specific to alpl proteins, are conserved in *X.laevis* and *tropicalis* sequences [478]. Another alpl feature is the calcium-binding site, composed of 76 residues. Sequences analysis shows that there is less than 60% of identity between human and amphibian sequences within this domain. Although this region is not that well conserved in *Xenopus* sequences, the residues F<sup>290</sup>, E<sup>291</sup> and D<sup>307</sup> that binds calcium are present in *Xenopus* alpl proteins [93, 113]. Out of the five putative N-glycosylation sites (motif=NXS/T/C) identified in human ALPL, three are conserved in the three amphibian sequences.

We further addressed if the *Xenopus* identified proteins may have alkaline phosphatase (AP) activity. Embryos were co-injected with *X.laevis* alpl.a and *LacZ* RNA into one blastomere at stage 2-cell embryo and analysed for AP activity (**Figure 5**). Strong AP activity staining was observed in the injected side identified by the X-Gal staining. No staining was observed following *LacZ* RNA alone injection.





**Figure 6. Embryonic spatial expression profile of *alpl.a* gene.** Whole mount *in situ* hybridization with specific antisense (a-f, g-k) and sense (g) DIG-labelled RNA probes was performed on embryos from stage 12.5 to 41. Dorsal view of embryos at stage 12.5 (a) and at stage 15 (b). Lateral views of embryos at stage 23 (c), at stage 26 (d), at stage 33/34 (e, g), at stage 37/38 (h) and at stage 41 (i,j). Details of the stained pronephros and retina of a stage 41 embryo (j). Transverse vibratome section (f) of the head at stage 33/34 Cryostat section (k) of the pronephric region at stage 41. The dotted lines correspond to planes of the transverse sections. For the lateral view, dorsal is up and anterior is left. b: blastopore; c: cloaca; e: eye; p: pronephros; pt: proximal tubules; r: retina



**Figure 7: *Alpl.a* knockdown induces the formation of a smaller eye.** Injection of 20ng of *alpl.a* MO2 and 250pg of *LacZ* mRNA were injected dorsally into the animal pole of 4-cell stage embryos. After culture to stage 41, embryos were fixed and photographed (A). Dorsal view and lateral views of the eyes on the injected (i) and non-injected (ni) sides. The midline of the embryo is represented by the dashed line. The morphology of the eye was then analysed by eosin and hematoxylin staining on head paraffin sections (B). CMZ: ciliary marginal zone; GCL: ganglion cell layer; inl: inner cell layer; L: lens; onl: outer cell layer; rpe: retinal pigmented epithelium.

### **Spatial expression profile of *X.laevis* *alpl.a***

*X.laevis alpl.a* zygotic expression was detectable during *Xenopus* development by RT-PCR with higher level in eye and kidney [418]. We further analysed its expression profile by *in situ* hybridisation (**Figure 6**). *Alpl.a* expression is detected at stage 12.5 in the mesoderm around the blastopore and weakly in the neural plate. This weak neural expression is still observed at stage 15. The expression around the blastopore and cloaca remains during the organogenesis phase until stage 37/38. Expression in the eye is seen from stage 23 until stage 41. This expression becomes intensified at stage 33/34 and is restricted in the retina. The expression level in the eye decreases from stage 37/38 but sectioning shows that expression of *alpl.a* is limited to the ciliary marginal zone of the retina. Transcripts are also observed in the pronephric region at stage 33/34. Kidney *alpl.a* expression level increases until stage 41 at which stage *alpl.a* is intensively expressed in the proximal tubules. Sectioning of a stained embryo at stage 41 confirms the pronephric tubule expression. No expression was detected with the sense probe.

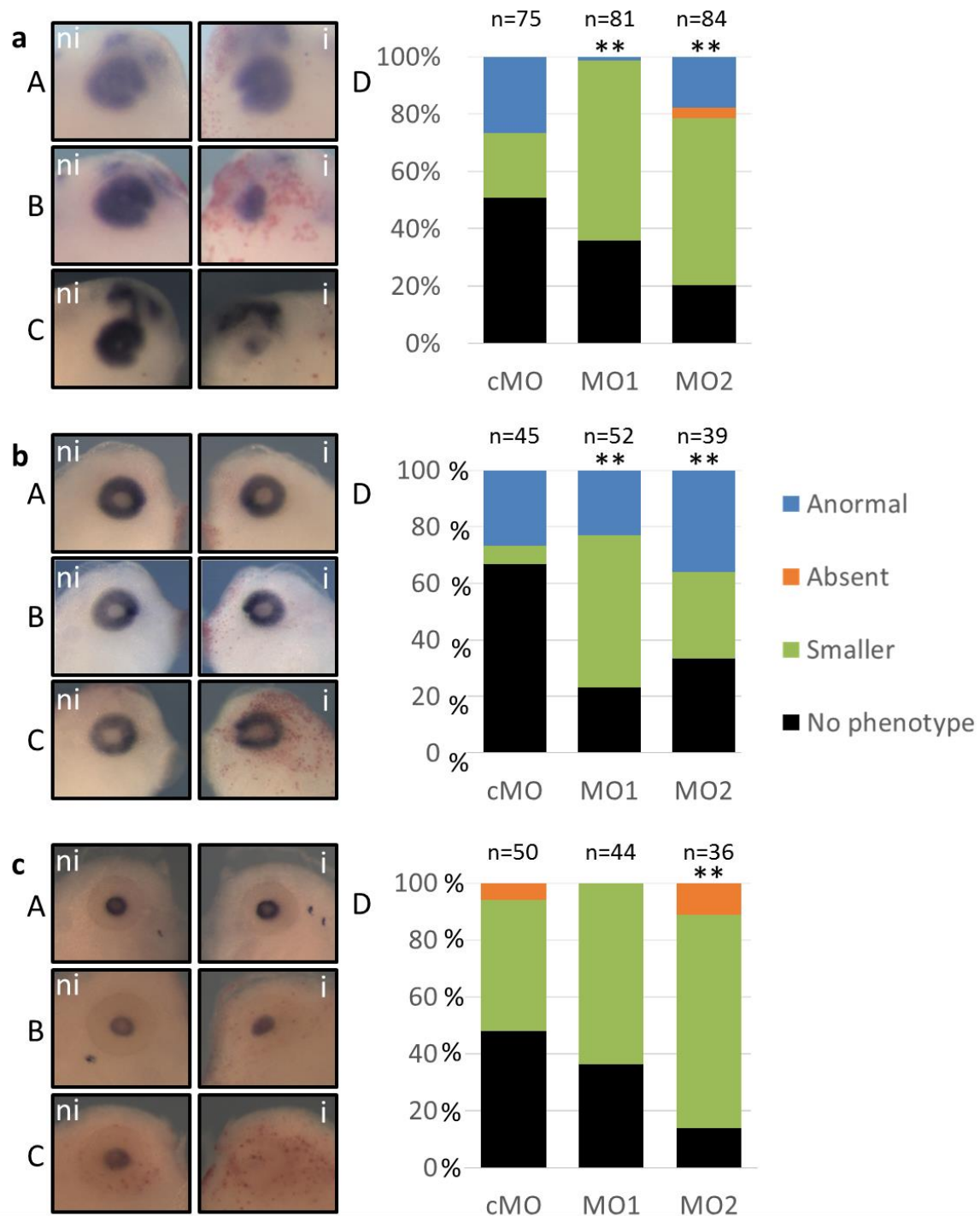
### **Specificity and efficiency of the *alpl.a* MOs**

To determine whether *alpl.a* is required for normal pronephros and eye development, we generated two morpholino oligonucleotides (MOs) (**Figure 2a**). Before their use *in vivo*, we addressed their specificity and efficiency by *in vitro* and *in vivo* approaches (**Figure 2b-d**). *In vitro* translation assay showed that both MO1 and MO2 morpholino, and not control MO, inhibited *alpl.a* translation efficiently. In a separate set of experiments, we demonstrated that neither the translation of human nor mouse mRNAs were inhibited in the presence of MO1 or MO2. We further tested the efficacy of *alpl.a* MO *in vivo*. The *alpl.a*-GFP-pCS2+ plasmid was generated by sub-cloning the *alpl.a* 5' UTR (target of the MO2) and ORF in frame with the GFP tag. *X.laevis* embryos were first injected at one-cell stage with the *alpl.a*-GFP or GFP mRNA and then into one blastomere at two-cell stage with *alpl.a* MO1 or cMO in presence of *LacZ* mRNA. As seen in **Figure 2d**, the *alpl.a*-GFP fluorescence is only detected on one side, opposite to the MO1 injection side, in the majority of the embryos whereas no such extinction of fluorescence can be detected following cMO injection. GFP fluorescence was not significantly altered following *alpl.a* MO1 injection. These data demonstrate that both *alpl.a* MOs can be used in loss of function experiments.

### ***Alpl.a* knockdown alters eye formation**

To determine if *alpl.a* was involved in eye formation, embryos were injected with 5, 10 or 20 ng of *alpl.a* MO1 or MO2 was injected dorsally at stage 4-cell into the animal pole in order to target the eye tissue. Stronger eyes phenotypes (in 82% of the analysed embryos, n=28) were observed with the dose of 20 ng of MOs with no obvious other morphological abnormalities (**Figure 7**). Knockdown of *alpl.a* resulted in the formation of smaller eye on the MO2 injected side associated with retina defects





**Figure 8: Alpl.a MO injection alters eye development.** Embryos were targeted dorsally in the animal pole with 20 ng of cMO (A) or *alpl.a* MO1 (B), MO2 (C) and 250pg of *LacZ* mRNA at 4-cell stages and analysed by *in situ* hybridization with the following eye probes: *pax6* (a) at stage 37/38, *rax* (b) and *pitx3* (c) at stage 35/36. Scoring of the stained embryos following cMO, *alpl.a* MO1 or MO2 (D). The histogram represents the percentage of scored embryos (n) displaying or not an alteration in the markers expression domain. The asterisks represent the significance level of the results. i: injected side; ni: non-injected side.

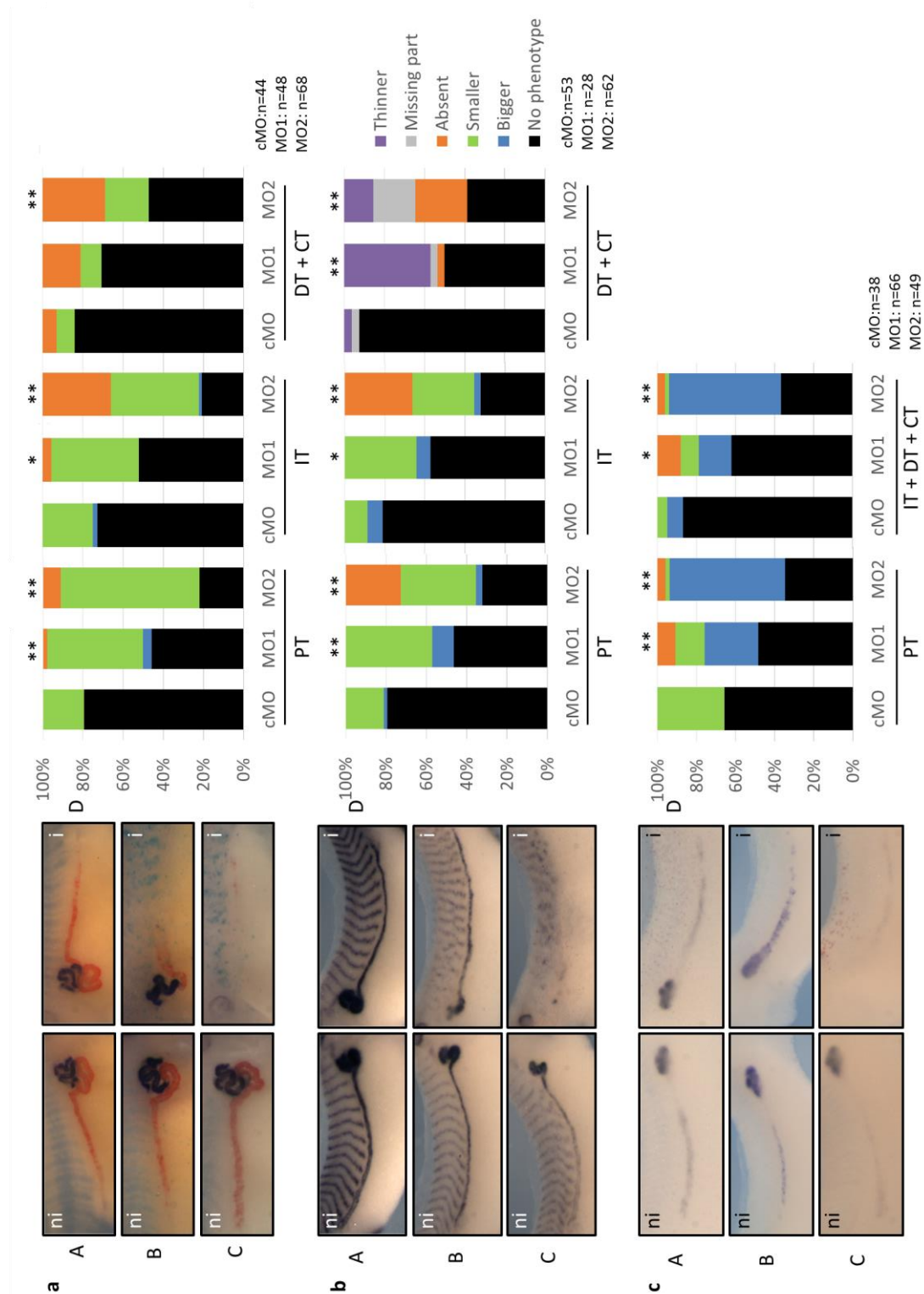
as visualised by the retinal pigmented epithelium (RPE) malformations (n=6). However, the affected eye exhibited a normal cellular organization as all the retinal cell layers could be identified (**Figure 7a**). In the most severe cases (n=3), complete disorganization and lack of the retina cell layers could be observed, whereas the lens was always present (**Figure 7b**).

To further investigate this phenotype, embryos injected with *alpl.a* MOs were examined by whole mount *in situ* hybridization using eye specific markers: *pax6* and *rax* (*rx1*) which marks the entire retina and *pitx3* the anterior lens epithelium (**Figure 8** and **Table 1a**). Injection of MO1 or MO2 resulted in reduction of *pax6* staining (in 63% and 58% of the analysed embryos n=81 and n=84, respectively). In rare cases (3.5% of the injected embryos), no *pax6* staining could be observed following *alpl.a* MO2 injection. *Rax* staining was also affected following *alpl.a* knockdown. More than 50% of the injected embryos (n=52) showed *rax* reduced expression after MO1 injection whereas this phenotype was observed in 30% of the injected embryos (n=39) after MO2 injection. A similar percentage of embryos showed abnormal stained expression domain, more extended along the antero-posterior axis. The expression of *pitx3* was also severely affected following *alpl.a* MOs injection. Strong reduction and absence of staining was observed in 75% and 11% of the injected embryos (n=36) after MO2 injection. MO1 injection resulted in *pitx3* reduced expression at similar frequency (in 64% of injected embryos, n=44) although no absence of staining was observed in any analysed embryos. Statistical analysis confirmed there are significant differences in *pax6*, *rax* and *pitx3* expression between MO2 and cMO injected embryos. These data demonstrate that normal level of *alpl.a* is required for normal eye development.

### **Alpl.a knockdown results in formation of smaller pronephros.**

To address the potential functions of *alpl.a* during kidney formation, *Xenopus* embryos were injected with 20ng of MO1, MO2 and cMO in the ventral vegetal blastomere at 4-cell stage, cultured until stage 41 and analysed by immunohistochemistry with the 3G8 and 4A6 antibodies (**Figure 9a** and **Table 1b**). The 3G8 antibody marks the proximal tubules and the 4A6 the intermediate, distal and collecting tubules. Injection of both *alpl.a* MO resulted in reduction of expression of 3G8 in 48% and 69% of the analysed embryos (n=48 and 68 respectively). No staining was also observed in 2% of the MO1 and 9% of the MO2 injected embryos. The expression of 4A6 was also altered, although the intermediate tubules are the most affected segment, with 44% and 34% of the MO2 injected embryos showing reduced or absent staining respectively. Absence of 4A6 staining was nonetheless the major MO1 and MO2 distal and collecting tubules phenotypes.

To investigate pronephric *alpl.a* role in more details, *alpl.a* MO1 and 2 injected embryos were examined for *Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase* expression at stage 35/36 (**Figure 9b** and **Table 1b**). Strong reduction of staining in the proximal and intermediate tubules was observed following both *alpl.a* MO injection, although more MO1 injected embryos displayed this phenotype. However, MO2 injection resulted in



**Figure 9: MO knockdown of *alpl.a* alters kidney formation.** Embryos were injected with 20 ng of cMO (A) or *alpl.a* MO1 (B), MO2 (C) and 250pg of *LacZ* mRNA into the ventral vegetal blastomere at 4-cell stages and analysed by immunohistochemistry with the 3G8 and 4A6 antibodies (a) at stage 41 and *in situ* hybridization with the following probes: *Na+K+-ATPase* (b) at stage 37/38 and *pax8* (c) at stage 27/28. Scoring of the stained embryos following cMO, *alpl.a* MO1 or MO2 (D). The histogram represents the percentage of scored embryos (n) displaying or not an alteration in the markers expression domain. The asterisks represent the significance level of the results. i: injected side; ni: non-injected side. CT: collecting tubules; DT: distal tubules; IT: intermediate tubules; PT: proximal tubules.

the absence of *Na+K+-ATPase* staining in all pronephric tubules at a similar frequency (in 27,4%, 33,9% and 25,8% of the analysed embryos respectively, n=62), whereas only the most distal segments of 4% of the analysed embryos (n=28) showed no staining. However, 42,8 % of the MO1 injected embryos showed thinner distal and collecting tubules.

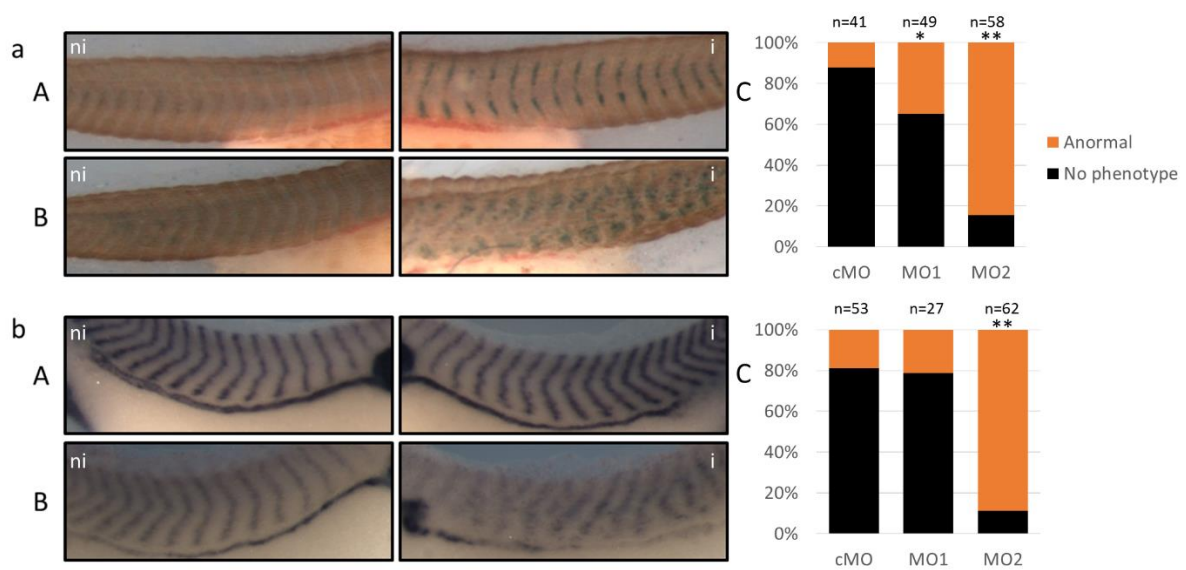
The expression of the early marker *pax8* of pronephric development was also affected in stage 27/28 *alpl.a* depleted embryos (**Figure 9c** and **Table 1b**). Although no staining was observed after MO1 and MO2 injection, the major phenotype observed was thicker, bigger tubules.

Taken together, these data demonstrate that *alpl.a* is necessary for normal pronephric development. The proximal and intermediate tubules formation was more severely affected by *alpl.a* knockdown, which is in agreement with *alpl.a* pronephric expression profile.

### **Alpl.a knockdown alters somite segmentation.**

During the course of this analysis, defects in somites were observed. To confirm if *alpl.a* depletion altered somites formation, 3G8/4A6 stained embryos were analysed at stage 41 by immunohistochemistry with the 12/101 antibody, which marks the differentiated muscle cells (**Figure 10a** and **Table 1c**). 84,5% of the *alpl.a* MO2 injected embryos (n=58) displayed somitic defects, with alteration of their segmented pattern. A similar phenotype was observed following MO1 injection, but at a lower frequency (44,7%, n=49). As the *Na+K+-ATPase* marker is also expressed in the developing somites [479], scoring of *Na+K+-ATPase* stained embryos confirmed the somitic disorganisation observed after *alpl.a* MO2 injection (**Figure10b** and **Table 1c**). However, no significant difference can be observed between *alpl.a* MO1 and cMO injected embryos. Moreover, positive muscle cells were stained with these two markers. These data demonstrate that *alpl.a* MO2 knockdown disrupts somite segmentation but not muscle cell differentiation.





**Figure 10: Alpl.a depletion disrupts somite formation.** Embryos were injected with 20 ng of cMO (A) or *alpl.a* MO2 (B) and 250pg of *LacZ* mRNA into the ventral vegetal blastomere at 4-cell stages and analysed by immunohistochemistry with the 121/101 antibody (a) at stage 41 and *in situ* hybridization with the *Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase* (b) at stage 35/36 probe. Scoring of the stained embryos following cMO, *alpl.a* MO1 or MO2 (C). The histogram represents the percentage of scored embryos (n) displaying or not somites defects. i: injected side; ni: non-injected side.

alpl.a	1	<b>TAA</b> TGAGACCAAGCGCAACAGAAAT-GAACTACCTCCACTCACACAAATC	49
		. .       .   . .     .	
alpl.b	1	<b>TAA</b> AGGGACCAAGCACAATAAAAAATAAACTAC-----C	34
alpl.a	50	CTG-TCGTCCCTGATGGACAATGGACT-----	75
		.       .   .   .	
alpl.b	35	CTGCCGTCCCTGATAGAGAATCGTCTCCCCTATTATATGAGGGCACTA	84
alpl.a	76	-----CATCCCAGAACCAGG-----	91
		.   .   .   .	
alpl.b	85	CCCCCAACATTCCATTTAGAGGTTATTTACTTTGTTATTATGTGATAC	134
alpl.a	92	-GGGTG---CACTGAACGGGGGCTAAGGTGC-----AGACCCCAATG	131
		.   .   .   .   .   .   .	
alpl.b	135	AGGGGAGCCCCAGTG---GGGGGGGT---GGGCAATTATAGA-----	170
alpl.a	132	CTCCTTTTATTAATTCAT-----GGTGTACCCTGCTTGCTCCCTCCA	174
		.   .   .   .   .	
alpl.b	171	----TTTTTTATTTGATTAAAGGGGTGCA-----	196
alpl.a	175	GTACATCACCCCT--CTGCCCTGCACCCCATTTCCCCAGCACCCCTCC	222
		.   .   .   .   .   .   .	
alpl.b	197	--AAAGGACCTCCTAAGT-----AT-----A	216
alpl.a	223	CCTTGTA-CATATCCAGTGGT-----CTCG---GTGCTGAAGCC	258
		.   .   .   .   .   .   .	
alpl.b	217	CATTGAATTATA----AGGGGTGACCAGACACATCGATAGGGCAAAGCC	262
alpl.a	259	-CCA-CATTCTTAAAT-----GTTTGCCATTT-----	285
		.   .   .   .   .   .   .	
alpl.b	263	ACCAGAATTGATAAGATGTGAGAGAAAAAAGAGTTG--CATTTCCTACT	310
alpl.a	286	-AATAAACATC-----TCCAG-----CCCCACAG-	308
		.   .   .   .   .   .   .	
alpl.b	311	AACTAAAC-TCATGAATTCATTGGCCAGACTGGAGAAGGACCCGCACAGC	359
alpl.a	309	-GCC---CAGATCCCAGGA-----GGAATTTGCGCAGG-----	336
		.   .   .   .   .   .   .	
alpl.b	360	AGCCAATCAGCTC---TGATCTTTTTTGTAAATGTCACTGAAATAAACCTC	406
alpl.a	337	-----	336
alpl.b	407	TCCCTGTCC	415

**Figure 11: Alignment of the 3'UTR sequences of the *alpl.a* and *alpl.b* cDNAs.** The stop codon is indicated in red. The sequence of the *in situ* hybridization probe is indicated in bold. The dots indicated the mis-pairs and the bars the conserved nucleotides.

## B. Perspectives: Results to be generated to complete this publication

### *Alpl.b* expression profile

The presence of this second *alpl* gene was only recently discovered, after the design of both the primers and *in situ* hybridization probe for *alpl.a*. We therefore checked if these molecular tools were *alpl.a* gene specific.

The *alpl.a in situ* hybridization probe is located in the 3'UTR sequence. The alignment of the 3'UTR sequence of *alpl.a* and *alpl.b* shows a weak percentage of identity (less than 38%) between these two sequences, suggesting that this probe is specific to *alpl.a* mRNA (**Figure 11**).

The forward primer used in our previous work [418] is located in the 5'UTR of *alpl.a* whereas the reverse primer is located in the coding sequence of *alpl.a* and can bind to *alpl.b* mRNA. However, we were not able to verify the specificity of the forward primer as no 5'UTR sequence is yet available for *alpl.b* mRNA. Nonetheless, based on the poor conservation of the 3'UTR region, we can make the hypothesis that the 5'UTR sequences are poorly conserved and that our forward primer may be specific of *alpl.a*.

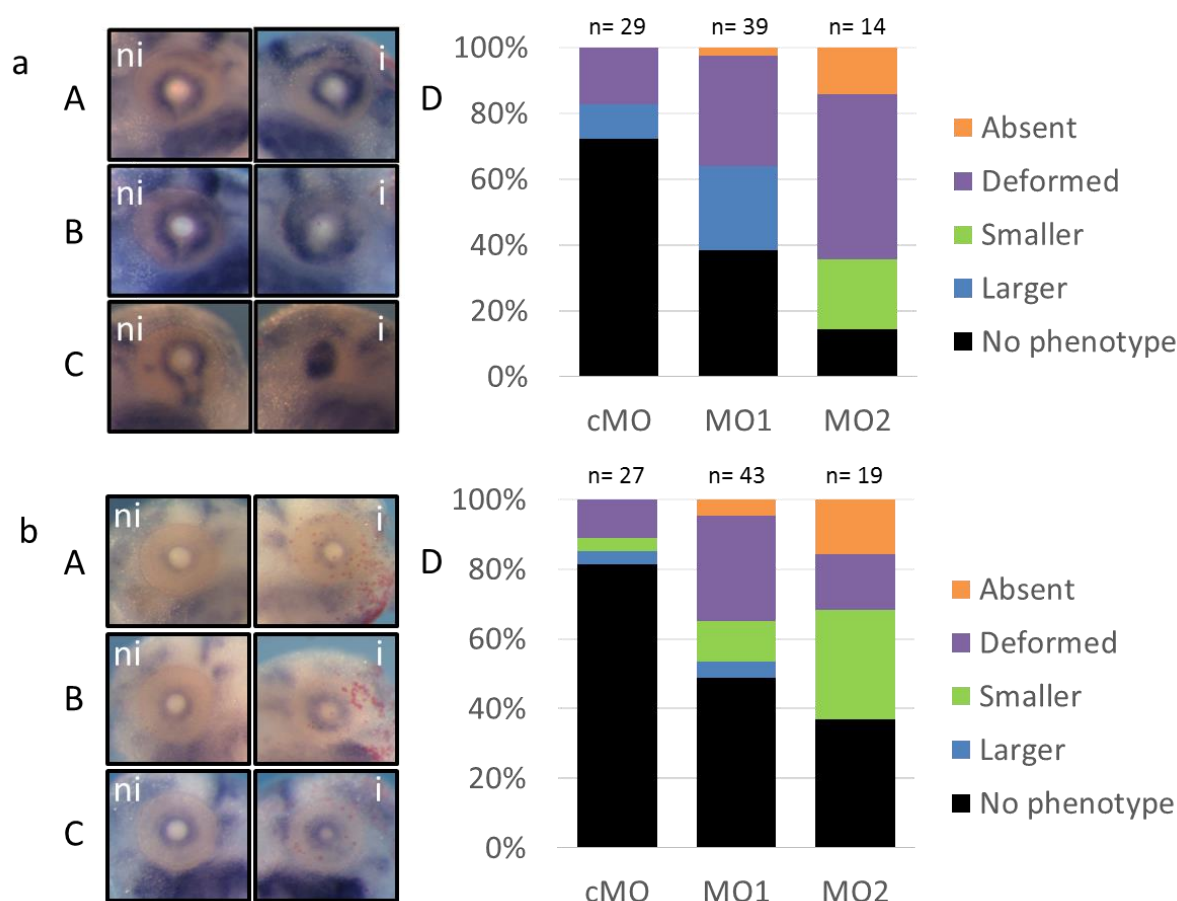
The first remaining result to generate is the embryonic expression profile of *alpl.b*. For this semi-quantitative RT-PCR will be performed with specific primers for both *alpl.a* and *alpl.b*. These primers will be designed based on two criteria: 1) each primer couple amplify only its target and not the homeolog and 2) each couple spans two exons, to prevent any genomic DNA amplification contamination. Depending on the RT-PCR results, *in situ* hybridization will be performed using a specific probe located in the 3'UTR of *alpl.b* mRNA. As no IMAGE clone is available for this cDNA, this probe will be directly cloned by PCR using *X.laavis* embryo or adult cDNAs. The source of the cDNA to use will be identified by the RT-PCR results.

It has been demonstrated that homeologs display distinct expression profile [318, 403]. We can therefore hypothesize that *alpl.a* and *alpl.b* may be expressed in different tissues, and that these duplicated genes may have been retained through a process of subfunctionalization.



	MO2	MO1
<i>alpl.a</i>	CGAGTGCC <b>AGCTTTGTGCCCAAGTGGAGAGA</b> ACG <b>ATGGT</b> GAAACTGTGGCTGTTGCTCCTGCT	
	* *                      * * *                      *	
<i>alpl.b</i>	CGAGCGCC <b>AGGCTTGTGCCCATACGGAGAGAGCG</b> ATGGTGAAGTGGGGTGCTGCTTCTGCT	

**Figure 12: Alignment of the 5'UTR of *X.laevis alpl.a* and *alpl.b* sequences and position of *alpl* MO1 and MO2 in relation to *Xenopus alpl.a* cDNA.** The ATG is indicated in red and the MO sequences are indicated in bold. The asterisks indicate the unconserved nucleotides over the MO sequences.



**Figure 13: Alpl.a MO knockdown alters the expression of ciliary marginal zone markers.** Embryos were targeted dorsally in the animal pole with 20 ng of cMO (A) or *alpl.a* MO1 (B), MO2 (C) and 250pg of *LacZ* mRNA at 4-cell stages and analysed at stage 41 by *in situ* hybridization with the following eye probes: *cyclin D1* (a) and *c-myc* (b). Scoring of the stained embryos following cMO, *alpl.a* MO1 or MO2 (D). The histogram represents the percentage of scored embryos (n) displaying or not an alteration in the markers expression domain. i: injected side; ni: non-injected side.

### **Specificity of the *alpl.a* MOs and *alpl.b* mRNA**

We aligned the ATG overlapping region of *alpl.a* with *alpl.b* to check the specificity of the *alpl.a* MOs (**Figure 12**). There are 3 mis-pairs between the sequences of MO1 and *alpl.b* mRNA and 6 between MO2 and *alpl.b* sequences.

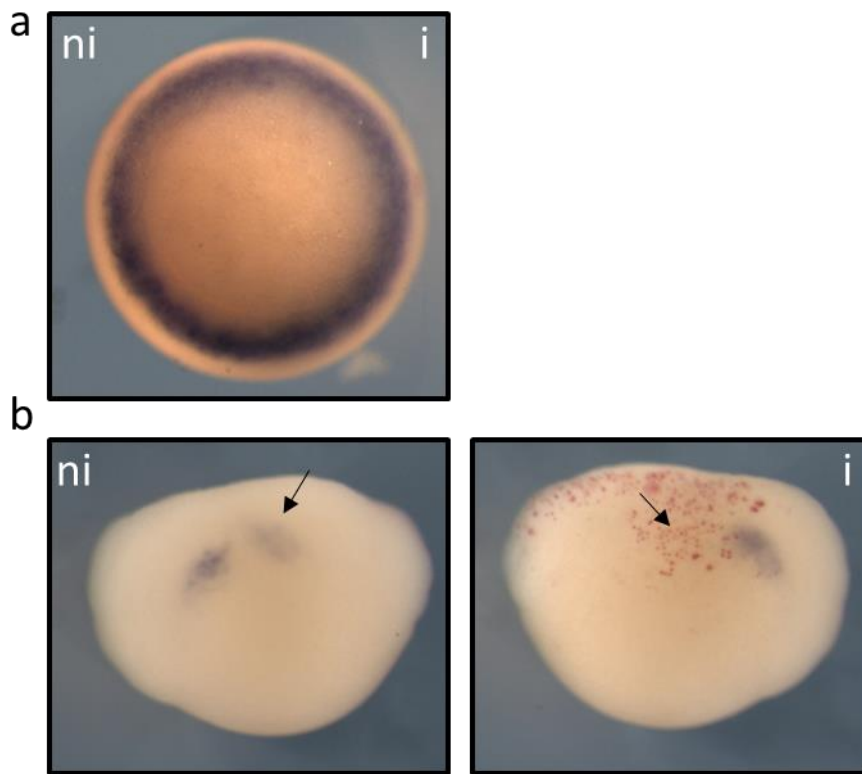
From Genetools website, a five mis-pairs MO can act as a control MO and not bind to the target mRNA sequence. However, these five mis-pairs need to be along the length of the MO and the majority of the mis-pairing is Cs and/or Gs. We have previously shown that four mis-pairs do not prevent the fixation of a MO to a homoeolog mRNA (cf enpp4 paper, **Supplementary Figure 6**). Therefore, we can speculate that the MO1 would bind to the *alpl.b* mRNA. However, it is not possible to predict the binding of MO2.

Depending of the expression profile of *alpl.b*, we will therefore need to address the binding of these MOs to *alpl.b* mRNA by performing a similar experiment that the one presented in **Figure 2b** and **2c**.

### **Alpl.a knockdown effects on eye formation**

The MO knockdown experiments demonstrated that *alpl.a* is involved during eye formation. As *alpl.a* is highly expressed in the ciliary marginal zone, we analysed stage 41 *alpl.a* MO injected embryos with *cyclin D1* and *cmyc*, two markers of this retina stem cells and progenitors enriched zone (**Figure 13** and **Table 2a**).

Although eye sectioning of these injected embryos has not yet been done, this preliminary experiment clearly confirmed the implication of *alpl.a* during retina formation. The *cyclin D1* expression is severely affected, as only 14% of the injected embryo displayed no alteration in *cyclin D1* expression domain following MO2 injection. Reduction and absence of staining was observed in 21% and 14% of the MO2 injected embryos whereas 50% of the injected embryos showed a deformed *cyclin D1* expression domain, e.g. not the “circle” around the lens, corresponding to the CMZ layer (**Figure 13aC**). MO1 injection also affected its expression although the major phenotypes observed were a deformed or enlarged expression domain, as shown on the **Figure 13aB**. The expression of *c-myc* was also affected, and similar phenotypes were observed following MO1 and MO2 injection. As observed previously, the MO2 injection induced a more severe phenotype than the MO1 one, with 16% of the MO2 embryos (n=19) versus 5% of the MO1 injected MO (n=43) showing no *c-myc* staining. Reduction of the expression domain was also induced in a large proportion of embryos by MO2 injection (in 31,5% of the embryos) as seen in **Figure 13bC**. Deformed or enlarged (thicker) expression domain was also observed in 30% and 5% of the MO1 injected embryos (**Figure 13bB**). These preliminary data suggest that *alpl.a* is necessary for normal retina and in particular CMZ development.



**Figure 14: Alpl.a MO knockdown alters the expression of early kidney *pax8* markers, but not mesodermal *xbra* marker.** Embryos were targeted one cell with 20 ng *alpl.a* MO2 and 250pg of *LacZ* mRNA at 2-cell stages and analysed at stage 10,5 by *in situ* hybridization with the mesodermic probes: *xbra*. Vegetative view. (a). Embryos were targeted ventrally in the vegetal pole with 20 ng *alpl.a* MO2 and 250pg of *LacZ* mRNA at 4-cell stages and analysed at stage 13 by *in situ* hybridization with the early pronephros probes: *pax8* (b). i: injected side; ni: non-injected side.

To further analyse the roles of *alpl.a* during eye formation, MO1 injected embryos were examined at earlier stages by *in situ* hybridization using *pax6* probe (**Table 2b**). Although 34,1% and 51,1% of the MO1 injected embryos showed a reduction in *pax6* expression domain at stages 16 and 23 respectively, no significant statistical differences were observed between *alpl.a* MO1 and cMO injected embryos. However, less than 20 cMO injected embryos were analysed and 18,8% and 31,6% of the analysed embryos showed a similar phenotype at stage 16 and 23 respectively. This preliminary experiment needs to be repeated but suggest that *alpl.a* might not be involved during early stage of eye development.

### **Alpl.a knockdown effects on kidney formation**

In order to clarify at which stage of pronephric development *alpl.a* is involved, *alpl.a* MO injected embryos were examined for *pax8* expression at stage 13 (**Figure 14a** and **Table 2c**). Although no *alpl.a* expression is detected at this stage, our RT-PCR experiments showed high level of *alpl.a* expression in the mesodermic tissues during gastrula stages [418]. Although this experiment was carried out only once, a reduction and absence of *pax8* staining was observed in 14% and 70% *alpl.a* MO2 injected embryos respectively (n=16).

As *alpl.a* MO2 depletion severely altered somite and kidney formation, two mesoderm derivatives, we addressed the potential function of *alpl.a* during mesoderm formation by examining the expression of the pan marker *xbra* in MO2 gastrula (**Figure 14b** and **Table 2d**). Its expression profile was normal in 81% of the injected embryos and we were unable to find any significant statistical difference between *alpl.a* MO2 (n=41) and cMO (n=47) injected embryos. This data shows that *alpl.a* knockdown has no effects on mesoderm induction and that the kidney phenotypes are not due to general mesoderm defects.

Our data shows that *alpl.a* is involved during pronephric development, especially in proximal and intermediate tubules formation. To further address *alpl.a* functions during kidney formation in more detail, the expression of other tubules markers in *alpl.a* MO injected embryos will be examined: the proximal tubules marker *slc5a1*, the intermediate and distal marker *slc12a* and the intermediate, distal and collecting tubules marker *clcnkb*.

### **Alpl.a MO rescue experiments**

To confirm the specificity of the knockdown of *alpl.a* expression on pronephric and eye development, it is necessary to perform rescue experiments. We decided to use mouse or human *ALPL* mRNAs as the whole *alpl.a* MO1 and MO2 sequences are poorly conserved between the amphibian and mammal species (**Figure 2a**). Eucaryotic expression clones for human and mouse cDNAs were obtained



and used directly to generate synthetic Alpl or ALPL mRNAs and proteins. As shown in **Figure 2c**, neither *alpl.a* MO1 nor MO2 can alter their translation. We further tested these clones by performing an AP activity staining, as described in the methods section. However, AP activity staining was only observed following mouse *Alpl* mRNA injection (**Figure 5d, and data not shown**). These data shows that the rescue experiments can be carried out using mouse *Alpl* mRNA and not human *ALPL* mRNA.

### **Mutant alpl.a over-expression studies**

In mammals, the loss of Alpl enzymatic activity induces seizures and hypophosphatasia due to the accumulation of Alpl substrates PPi and PLP [117, 468]. However, it has been shown that ALPL can interact with extracellular matrix proteins such as collagens or with cellular prion protein [123, 480]. To assess the implications of the enzymatic activity of *alpl.a* in pronephric and eye development, we generated a construct containing a point mutation in the crown domain, as described in the methods section and in **Figure 1**.

This mutation R391A results in a loss of human enzyme function [98]. We checked if this mutant protein was inactive by performing the *in vivo* AP activity-staining test (**Figure 5f**). No AP staining could be observed following *alpl.a-R391A* mRNA injection, despite the increased time of the staining reaction (compare the panel e to a). As the TNAP proteins act as homodimers and can not act as heterodimers with other alkaline phosphatases, this construct will be used as a dominant negative [94].

Indeed, the over-expression of this enzymatic inactive protein may bind to the endogenous *alpl.a* protein and this *alpl.a-R391/alpl.a* dimer might become inactive as the exogenous *alpl.a-R391* homodimers.

We could also use mutant inactive proteins in rescue experiments. Indeed, if an inactive *alpl.a* protein is able to rescue the *alpl.a* MO phenotypes, this will demonstrate that the enzymatic activity of *alpl.a* is not necessary for kidney and eye development. To do so, we will need to generate other constructs, which do not contain the MO binding sequences.

### **Identification of the signalling pathway involved: the adenosine signalling pathway?**

A key result is to identify which substrate(s) is (are) hydrolysed by *alpl.a* alkaline phosphatases and/or which signalling molecule is generated by this enzyme which could be involved in the pronephric and eye formation. The ALPL enzymes display broad substrate specificity and therefore are involved in several signalling pathways [95]. One of this pathway already known for its importance in kidney physiology is the purinergic signalling pathway and in particular the adenosine signalling pathway [225, 226]. We therefore hypothesized that the observed phenotypes are caused by the alteration of extracellular ATP/ADP/adenosine concentrations, leading to a reduction of P1 signalling and/or



increase of P2 signalling. As an initial attempt towards the identification of the substrates and generated products, *Xenopus* stage 5 oocyte nuclei were directly injected with *alpl.a*R391A-pCS2+ plasmid. After 48 hours, 20 over-expressing oocytes or control oocytes were washed into Ringer's buffer and then incubated with 200µL of a mix of nucleotide triphosphates (ATP, CTP, GTP and UTP (0,45nM each)) or monophosphate (AMP, CMP, GMP, IMP and UMP (0,45nM each)) in HEPES 10mM, NaCl 115mM, KCl 2,5mM and MgCl<sub>2</sub> 1mM. 10µl of supernatant were snap frozen on dry ice at time t = 0, 1, 3, 5 or 10 min and stored. Nucleotides and nucleosides were separated and quantified by reverse phase HPLC. No differences can be observed between the *alpl.a* over-expressing and control oocytes.

The identification of *alpl.a* enzymatic activity will now be addressed *in vitro* by over-expressing the *alpl.a* protein into a cell line. Stable CHO transfected cells will be used and *alpl.a* enzymatic characteristics studied as described previously ([403] and see above).

MO *alpl.a* rescue experiments will be then carried out by either bathing the *alpl.a* MO embryos into a medium containing the identified product(s) of the enzyme or by directly injecting this (these) product (s) into the *alpl.a* MO embryo. As several products may be identified, this rescue experiment will allow discriminating which one is involved in the *alpl.a* MO eye and kidney phenotypes.

### **alpl.b functions?**

Another aspect of this work will be to address the physiological relevance of the maintenance of the *alpl* homeologs. The comparison of the embryonic expression profile of both *alpl.a* and *alpl.b* may provide some answers. As *alpl.a* and *alpl.b* proteins display 92% of identity, we can expect *alpl.b* to be an alkaline phosphatase. We could easily test this enzymatic activity but we will first need to clone the full length of *alpl.b* coding region, which is not yet available in *X.laevis* clone databases. We could also perform *alpl.a* MO rescue experiments with the injection of *alpl.b* mRNA. This again would require the cloning of *alpl.b* cDNA.

In case of co-expression of *alpl.b* and *alpl.a* in the same pronephric segment or eye region, we could address the potential redundancy of these proteins. Specific *alpl.b* and/or *alpl.a* MOs may be generated. Single or double targeted MOs injections will be performed and pronephric or eye phenotypes compared. In case of redundancy, we expect to observe worsened phenotypes with combined *alpl.a* and *alpl.b* MOs injection.





## C. Conclusion et discussion

### 1. L'alcaline phosphatase tissu-non spécifique présente un profil embryonnaire d'expression tissu spécifique.

Alors que l'expression embryonnaire de l'*alpl.a* apparaissait ubiquitaire par RT-PCR, avec toutefois des différences de niveaux d'expression tissulaires à des stades tardifs, (**fig 4** - [418]), son expression embryonnaire est en fait très spécifique, détectée principalement au niveau de la rétine et du rein par hybridation *in situ*. Cette différence est certainement due à la différence de sensibilité des deux techniques. Cette expression embryonnaire tissu-spécifique n'est toutefois pas retrouvée chez d'autres vertébrés. Chez le poisson zèbre, l'expression de l'*alpl* a également été étudiée par RT-PCR [118] et par hybridation *in situ* [481]. Ce gène est exprimé de manière ubiquitaire, mais ces études ont été effectuées que sur des stades larvaires, et non embryonnaires. Chez la souris, le profil d'expression d'*akp2* (gène murin orthologue de l'*alpl*) observé par hybridation *in situ* dans l'embryon en fin d'organogenèse est plutôt ubiquitaire avec une forte expression dans le squelette du tronc et le cartilage des membres et de la tête. Cependant, aucune expression n'est reportée dans le rein, et l'œil ne semble que faiblement marqué [302]. De plus, l'activité spécifique de cet enzyme est détectée par histochimie de manière quasi-ubiquitaire dans un embryon de souris au même stade, en accord avec la détection des transcrits par RT-PCR [131]. Cette différence de profil d'expression embryonnaire entre la souris et le xénope peut s'expliquer par le fait qu'il existe deux gènes homéologues *alpl* chez *Xenopus laevis*. En effet, l'expression du gène *alpl.b* est encore inconnue et pourrait compléter l'expression détectée chez la souris. De plus, chez les mammifères, l'expression du gène *alpl* est sous la dépendance de deux promoteurs différents, conduisant à des profils d'expression distincts des deux transcrits [131]. On peut émettre l'hypothèse que l'utilisation de promoteurs alternatifs peut « reproduire » l'existence de deux ARN *alpl* chez *X.laevis*.

### 2. Rôle de l'*alpl.a* dans la formation de l'œil

Nous avons pu voir que l'expression de l'*alpl.a* est détectée dans la plaque neurale dès la fin de la gastrulation et dans les tissus oculaires dès la fin de la neurulation. Comme son orthologue de *X.tropicalis* [381], *alpl.a* se retrouve exprimée dans la zone marginale ciliaire de la rétine en fin d'organogénèse. De plus, nos travaux montrent que cette ectonucléotidase est impliquée dans le développement de l'œil. En effet, une réduction de l'expression de cette enzyme, entraîne une réduction de la taille de l'œil et également une perturbation de l'expression des marqueurs de la rétine *pax6* et *rax* à des stades tardifs.

Compte tenu de l'expression de l'*alpl.a* dans la zone marginale ciliaire, ces phénotypes oculaires peuvent s'expliquer par une altération des cellules souches ou progénitrices et donc de la différenciation



et/ou de la prolifération cellulaire. En effet, l'expression des marqueurs de la zone marginale ciliaire (*cyclin D1* et *c-myc*) semble être affectée par une inhibition de l'expression d'*alpl.a*. Cependant, dans la plupart des cas, la rétine semble contenir toutes les couches cellulaires qui la composent, bien que plus ou moins désorganisées et d'épaisseur réduite. Ce résultat ne semble pas indiquer un problème de différenciation cellulaire. Afin d'être certain de l'identité de chaque couche cellulaire observée, nous allons effectuer différents marquages immunologiques spécifiques à chacune, à partir de coupes histologiques de l'œil [482]. Pour vérifier si ce phénotype provient d'une diminution de la prolifération cellulaire, nous allons réaliser des expériences d'immunohistochimie avec l'analogue de la thymidine EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) et le marqueur phospho-histone H3. La réduction de la taille de l'œil peut également s'expliquer par une augmentation de l'apoptose dans les différentes couches de la rétine. Pour répondre à cette question, nous envisageons d'étudier ce phénomène sur des coupes l'œil d'embryons knockdown pour *alpl.a*, grâce à la méthode de TUNEL (pour Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling).

Aussi, bien que l'expression de l'*alpl.a* ne soit pas détectée dans le cristallin par hybridation *in situ*, l'expression du marqueur de l'épithélium externe du cristallin *pitx3*, est altérée. Le cristallin est néanmoins toujours présent, comme nous l'avons observé sur les coupes d'embryons injectés avec le MO *alpl.a*. Ceci suggère que l'absence de cette enzyme cause une altération de l'épithélium du cristallin, mais ne semble pas affecter la formation des fibres qui le composent. Cette observation peut s'expliquer par l'échange de signaux entre la rétine et le cristallin nécessaire pour le développement normal de l'œil et par le fait que la rétine neurale permet la différenciation d'une partie de l'épithélium du cristallin en fibre secondaires par l'intermédiaire de la voie de signalisation du FGF. Il est également possible que le cristallin soit globalement plus petit, à cause d'une diminution de signalisation provenant de la rétine, tout au long du développement oculaire.

Peu de données sont disponibles concernant les fonctions de la phosphatase *alpl*. Cependant, et de manière intéressante, l'enzyme *alpl* est impliquée dans la prolifération et la différenciation des cellules souches neurales [130]. En effet, l'inhibition de cette protéine par une stratégie shRNA inhibe d'une part la prolifération de neurosphères et d'autre part leur différenciation en neurones et oligodendrocytes. L'*alpl* pourrait donc jouer un rôle dans la prolifération et la différenciation des cellules souches de la rétine. Le fort marquage de l'*alpl.a* dans l'œil de xénope adulte (**fig 4** - [418]) pourrait être relié à la croissance constante de l'œil chez cette espèce [386]. Chez l'homme adulte, une zone de l'œil contenant des cellules souches a été décrite dans l'endothélium de la cornée, permettant son remplacement lent [483]. L'activité de l'*alpl*, enzyme considérée comme un marqueur des cellules souches, est détectée dans cette zone de l'œil, suggérant son rôle dans la différenciation de ces cellules. Il n'existe cependant pas d'autres informations concernant le rôle de l'*alpl* dans la fonctionnalité de l'œil, chez l'adulte ou chez l'embryon. Nos résultats sont donc les premiers à démontrer l'implication fonctionnelle de l'*alpl* dans la mise en place de l'œil embryonnaire.



### 3. Rôle de l'*alpl.a* dans la formation du pronephros

L'*alpl.a* est exprimé dans le pronephros dès le milieu de l'organogenèse et chez l'adulte, son expression est forte dans le mésonéphros (**fig 4** -[418]). Cette expression rénale adulte concorde avec le fait que les phosphatases alcalines sont exprimées dans les tubules proximaux chez le rat adulte ([125] et **figure 30**). De plus, nos résultats montrent que cette enzyme est impliquée dans la formation du rein. En effet, l'inhibition de l'expression de cette ectonucléotidase entraîne des altérations dans la genèse du pronephros, comme le montre la perturbation de l'expression du marqueur rénal  $Na^+K^+-ATPase$  et de la reconnaissance des tubules rénaux par les anticorps 3G8/4A6 à des stades tardifs. Bien que l'expression de l'*alpl.a* soit détectée par hybridation *in situ* dans les tubules proximaux, la formation de la totalité des segments rénaux est perturbée par une inhibition de l'*alpl.a*. Ceci pourrait s'expliquer par des défauts au niveau de la spécification du champ pronephrique et/ou de la différenciation cellulaire lors de la mise en place de l'ébauche pronephrique. En effet, nos résultats préliminaires montrent une perturbation de l'expression du marqueur précoce *pax8* indispensable à la détermination pronephrique au début de la neurulation. Cependant, les étapes de détermination rénale et de différenciation de l'ébauche rénale ont lieu avant que l'expression du gène *alpl.a* ne soit détectée par hybridation *in situ*. Néanmoins, par RT-PCR les transcrits de l'*alpl.a* sont détectés dans les tissus mésodermiques dès la gastrulation (**fig 6** -[418]). Il est également possible que les phénotypes observés soient dus à des défauts de la prolifération cellulaire lors de la fonctionnalisation du rein et de l'allongement des tubules. En effet, cette étape se déroule aux stades où l'*alpl.a* est détecté par hybridation *in situ* dans les tubules proximaux.

Pour répondre à ces deux hypothèses, nous allons reproduire les résultats préliminaires montrant une altération du gène *pax8*. Ceux ci seront couplés à l'étude de l'effet de l'injection du MO *alpl.a* sur l'expression de *lhx1*, mais aussi des gènes iroquois, *irx1* et *irx3*, également des marqueurs du champ pronephrique et nécessaires au développement pronephrique [484]. L'impact de l'inhibition de l'*alpl.a* sur la formation/différenciation des différents tubules pronephriques sera également analysé en utilisant des marqueurs spécifiques des tubules proximaux (*slc5a1*), des tubules intermédiaires et distaux (*slc12a*) ou des tubules intermédiaires, distaux et collecteurs (*clcnkb*). Enfin, un marquage immunohistochimique EdU/pH3 sera également envisagé pour analyser l'impact de l'inhibition de l'expression d'*alpl.a* sur la prolifération cellulaire. Celui ci sera couplé à un marquage spécifique du néphron comme récemment publié par l'équipe du Dr. O.Wessely [485]. L'apoptose cellulaire sera également une hypothèse à vérifier.

L'inhibition de l'*alpl.a* provoque aussi des défauts dans la segmentation des somites. En effet, la détection des cellules musculaires par l'anticorps 12/101 montre une désorganisation importante des chevrons suite à l'injection du MO *alpl.a*. La même observation peut être faite avec le marquage  $Na^+K^+-$



*ATPase*. Ces résultats démontrent que ce phénotype n'est pas dû à un défaut de différenciation cellulaire, car l'anticorps 12/101 reconnaît la présence de cellules musculaires.

Le rein et les somites étant dérivés du mésoderme, une hypothèse serait que les phénotypes observés dans ces deux tissus soient dus à une perturbation de l'induction mésodermique dès les plus jeunes stades. Or, l'expression du marqueur précoce mésodermique *xbra* n'est pas altérée par l'inhibition de l'expression d'*alpl.a*. En revanche, nos résultats obtenus par RT-PCR indiquent que l'*alpl.a* pourrait être exprimé dans le mésoderme paraxial et pourrait donc avoir un rôle dans la formation des somites (**fig 6** - [418]).

Lors de la formation du rein, la différenciation du tissu pronephrique dans le mésoderme intermédiaire est induite par un signal provenant des somites antérieures [449, 450]. Il est donc probable qu'un défaut dans la formation des somites par un manque d'expression d'*alpl.a* entraîne également des défauts dans la formation du rein. Pour vérifier cette hypothèse, il serait judicieux d'étudier l'expression des marqueurs somitiques à des stades précoces.

Outre son activité enzymatique, l'alpl possède également la propriété de se fixer à la matrice extracellulaire afin de moduler l'adhésion cellulaire [486]. De façon intéressante, la protéine alcaline phosphatase de l'axolotl est fortement exprimée au niveau du canal rénal en croissance (ou PND for elongating pronephric duct) et celle-ci est impliquée dans la migration cellulaire des cellules du canal rénal [487]. Cependant, chez *X. laevis*, *alpl.a* n'est pas exprimé au niveau des tubules distaux en formation et ce rôle de molécule associée à la migration cellulaire rénale (ou CGAM pour cell guidance associated molecule) ne semble pas avoir été conservé au cours de l'évolution. Cependant, notre étude est la première à démontrer que la protéine alpl est nécessaire à la formation du rein chez un vertébré.

#### 4. **Activité phosphatase nécessaire aux rôles embryonnaires de l'alpl.a ?**

Le rôle de l'alpl est peu connu. Cette phosphatase est impliquée dans la pathologie hypophosphatasie, caractérisée par une accumulation du substrat PPi et une inhibition de la minéralisation osseuse chez l'homme et la souris ainsi que des crises d'épilepsies dues à une accumulation de PLP [112]. Chez la souris, une perte de l'expression constitutive d'*Akp2* entraîne la mort des nouveau-nés avant leur sevrage, et ces souriceaux présentent les mêmes signes pathologiques que les enfants atteints d'hypophosphatasie infantile [116, 423].

L'alpl pourrait donc intervenir dans la formation de la rétine et des tubules rénaux à travers la déphosphorylation d'un ou plusieurs de ses nombreux substrats. L'enzyme alpl peut, entre autre, produire de la pyridoxine à partir du PLP. Un manque de pyridoxine ou vitamine B6 chez le rat entraîne des défauts dans le développement neural et également un délai dans l'ouverture des yeux chez les nouveau-nés [488]. De plus, l'alpl déphosphoryle séquentiellement l'ATP en ADP, AMP et adénosine.





Une perte de l'équilibre de la production de ces molécules pourrait avoir des effets néfastes sur la mise en place de ces tissus car l'ATP et l'adénosine jouent des rôles antagonistes dans la prolifération de certains types cellulaires. En effet, l'ATP induit la prolifération des cellules souches hématopoïétiques et mésenchymateuses humaines à travers l'activation des récepteurs P2X, alors que l'adénosine a un rôle plutôt inhibiteur de la prolifération *via* les récepteurs P1 (ADORA) [196]. Notre hypothèse selon laquelle l'activité phosphatase est liée aux phénotypes observés suite à la déplétion de l'enzyme est renforcée par l'absence de phénotype majeur observée lors des expériences de surexpression. Il est en effet possible que le ou les substrat(s) soit (soient) limitant(s) pour l'activité enzymatique de l'alpl. Il est également possible que les récepteurs ou ligands de ces récepteurs générés par l'alpl ne soient pas en quantité suffisante pour entraîner une réponse cellulaire excessive. Pour répondre à cette question, il serait intéressant de surexprimer en parallèle de l'*alpl*, des enzymes de production de ses différents substrats et/ou les ligands ou récepteurs des divers produits de cette enzyme. Les ARNm des récepteurs *adora1* et *adora2a* de *Xenopus laevis* sont disponibles au laboratoire et pourraient être les premiers à être testés pour vérifier l'implication de l'adénosine dans la formation embryonnaire de l'œil et du rein.

#### 5. Mécanisme d'action de l'alpl.a dans la formation de ces tissus : Implication de la voie de signalisation purinergique ?

L'alpl comme molécule modulatrice de la voie de signalisation purinergique est une hypothèse très intéressante puisque cette voie de signalisation est cruciale pour la physiologie rénale [489], mais également pour la formation et fonctionnement de l'œil des vertébrés. Un grand nombre d'études réalisées chez le poulet a prouvé le rôle de l'ATP et adénosine dans la croissance de la rétine. Les récepteurs ADORA1 ont été localisés dans les couches pléxiformes (contenant les cellules horizontales et amacrines), ganglionnaire, nucléaire interne et photoréceptrice de la rétine en fin d'organogenèse [490]. L'adénosine, *via* les récepteurs ADORA1, stimule l'activation des récepteurs dopaminergiques D1, essentiels au développement de la rétine, par activation de l'adénylate cyclase et la production d'AMPc [491]. Toujours dans la rétine des embryons de poulet, l'ATP induit une augmentation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire par l'intermédiaire des récepteurs P2Y2 et P2Y4 [492]. Cette réponse serait caractéristique des cellules rétinienne embryonnaires précoces et participerait à la différenciation des cellules neuro-épithéliales ou des cellules progénitrices indifférenciées en neurones [493]. De plus, l'activation des récepteurs P2 par l'ATP serait impliquée dans la régulation de la synthèse d'ADN dans la rétine neurale à des stades embryonnaires précoces, et permettrait la régulation de la prolifération des cellules progénitrices en collaboration avec des facteurs de croissance [494]. L'ATP, *via* les récepteurs P2Y1 couplés à la PLC, PKC et aux MAP kinases, stimule la prolifération des cellules bipolaires et des cellules de Müller dans la rétine en développement précoce [495]. Cet ATP est relargué de l'épithélium pigmentaire rétinien *via* des héli-canaux et accélère la prolifération et la différenciation des progéniteurs rétiens [496]. Enfin, un rôle plus précoce pour la voie de signalisation purinergique, notamment pour l'ADP *via* le récepteur P2Y1, au cours de la formation de l'œil a été démontré chez le



xénope [403]. En effet, la sur-expression de l'ectonucléotidase NTPDase2, qui convertit l'ATP en ADP, chez le xénope, entraîne la formation d'yeux ectopiques en augmentant l'expression d'un des gènes maîtres du développement de la rétine: *pax6*.

Bien que nous n'ayons pas démontré que le ligand impliqué dans les phénotypes oculaires et rénaux causés par l'inhibition de la phosphatase *alpl.a* soit une purine, nos résultats par RT-PCR renforcent cette hypothèse puisque les récepteurs adora sont exprimés dans l'œil et le rein, ainsi que dans les tissus à partir desquels ils sont dérivés, tout au long de l'embryogenèse de *Xenopus laevis* (**fig 6 - [418]**). Enfin, l'expression de certains récepteurs P2Y ATP-dépendant (P2Y1.a, P2Y2 et P2Y4) a aussi été observée dans l'œil au cours de l'embryogenèse du xénope (Blanchard et Massé, non publié). Bien que l'implication de la voie de signalisation purinergique au cours de la formation du rein n'a pas été démontrée, l'expression des récepteurs P2X2.b et P2X4 au niveau des tubules proximaux pronéphriques a également été démontrée (Blanchard et Massé, non publié).

Comme détaillé en introduction, la mise en place de l'œil et du rein fait intervenir les mêmes voies de signalisation, comme par exemple les voies BMP, FGF, WNT, Notch et Hedgehog. Leur interaction est nécessaire pour le bon développement de ces tissus. Il est donc possible que la voie de signalisation purinergique, notamment celle de l'adénosine, régule elle aussi la formation de ces deux organes. Cette voie pourrait aussi interagir avec les voies de signalisation citées au-dessus. En effet, une interaction via le calcium entre les voies de signalisation purinergique et Wnt pourrait être envisagée.



# Conclusions et perspectives

L'ensemble des résultats obtenu au cours de mes trois années de thèse a permis de compléter le profil d'expression spatio-temporel des acteurs de la voie de signalisation de l'adénosine au cours du développement embryonnaire. En effet, la carte d'expression générée regroupe l'ensemble des gènes codant pour les acteurs de la voie de signalisation de l'adénosine : les ectonucléotidases produisant l'adénosine (cd73, alpl, alpi, et acpt), les enzymes de dégradation de l'adénosine (ada, pnp et adk), ainsi que les récepteurs adora et les transporteurs de nucléosides spécifiques à l'adénosine (cnt et ent). Cette carte d'expression embryonnaire a été produite chez le même modèle vertébré: *Xenopus laevis* et par utilisation des mêmes méthodes : RT-PCR et hybridation *in situ*. Elle permet donc de comparer l'expression de chaque acteur dans un même stade ou dans un même tissu embryonnaire et de faire le lien avec un rôle potentiel de l'adénosine au cours du développement. Ces résultats sont donc indispensables pour débiter des études fonctionnelles ciblées. De plus, les données concernant l'expression des gènes d'autres familles d'ectonucléotidases (entpdases et enpp, [403, 408]), ainsi que les récepteurs P2 ATP-dépendants (Blanchard et Massé, non publiés) peuvent être rajoutées à mes résultats de thèse. Les profils d'expression des récepteurs P2 restants seront prochainement établis par mon équipe afin d'obtenir la première carte d'expression des acteurs de la voie de signalisation purinergique, en vue de mieux appréhender les fonctions des purines extracellulaires, l'ATP, l'ADP et l'adénosine. Cette carte sera unique puisque les données d'expression embryonnaire des acteurs de cette voie de signalisation chez les autres espèces de vertébrés ne sont que parcellaires [295].

Ce travail m'a permis d'obtenir le profil d'expression spatio-temporel de l'ectonucléotidase alpl qui s'est avérée être très spécifique par hybridation *in situ*. En effet, au cours du développement embryonnaire, ce gène possède un profil d'expression dynamique dans le rein, ainsi que dans l'œil, et plus particulièrement dans la zone de la rétine possédant les cellules souches et progénitrices, la zone marginale ciliaire. J'ai donc décidé de sélectionner cette enzyme pour étudier sa fonction dans la formation de ces deux tissus. Ainsi, alors que l'alpl est décrite comme ubiquitaire chez les vertébrés, j'ai pu démontrer qu'elle possède des fonctions spécifiques lors du développement embryonnaire. L'inhibition ciblée de cette enzyme par la stratégie MO, nous a permis de mettre en évidence son rôle au cours du développement de la rétine et du pronephros, mais également du cristallin et des somites. Cette étude reste à poursuivre afin d'établir les mécanismes impliqués. Cependant, ce travail est le premier à établir les fonctions embryonnaires de cette enzyme.

L'ectonucléotidase alpl est incluse dans la voie de signalisation de l'adénosine car elle permet la production de cette molécule à partir de l'AMP. Cette phosphatase permet également la dégradation de l'ATP et de l'ADP et inhibe la signalisation purinergique agissant *via* les récepteurs P2. Nous avons vu

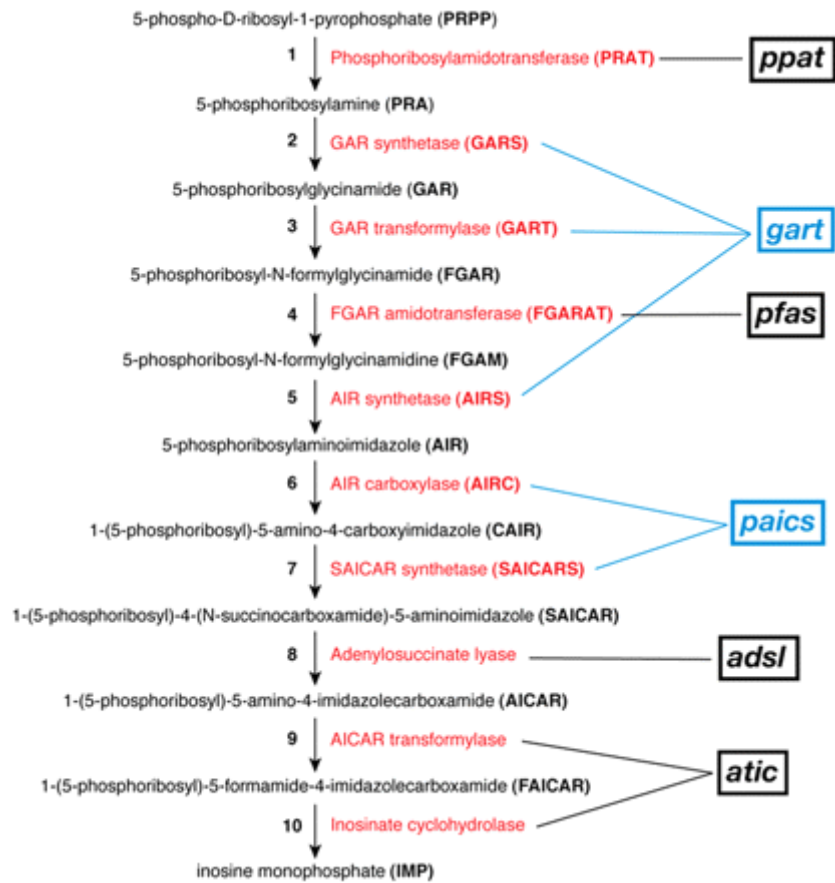


Figure 81 : **Voie de synthèse *de novo* des purines**. La synthèse d'IMP, précurseur pour l'AMP et le GMP, se déroule à travers dix étapes enzymatiques. Les molécules sont indiquées en noir, les enzymes catalysant la réaction en rouge et les noms des gènes de poisson zèbre sont encadrés en noir et en bleu. De [497].

le rôle important de cette voie de signalisation dans la physiologie et la physiopathologie de nombreux organes et notamment dans celles du rein [125, 489]. Il est donc probable que les phénotypes rénaux et oculaires observés soient dus, soit à une déplétion d'adénosine extracellulaire et une inhibition de la signalisation des récepteurs P1, soit à une augmentation de la concentration extracellulaire en ATP ou ADP et donc de la signalisation des récepteurs P2. Cependant, du fait de la présence de nombreux substrats de l'enzyme alpl, cette hypothèse reste à être confirmée. Si c'est le cas, ce travail constituera une nouvelle évidence de l'implication des purines extracellulaires lors du développement embryonnaire.

La production des purines extracellulaires peut se faire *via* les ecto-enzymes dans l'espace extracellulaire mais aussi *via* un transfert transmembranaire et synthèse intracellulaire. Cette synthèse des nucléotides puriques peut se faire, soit par la voie de récupération (salvage pathway), soit par la voie de synthèse *de novo*. Cette voie débute par la conversion d'un précurseur PRPP (5-phospho-D-ribosyl-1-pyrophosphate) en inosine monophosphate (IMP), à travers dix étapes enzymatiques (**figure 81**). L'IMP permettra la production d'AMP et de GMP qui serviront à leur tour de précurseur à la génération d'ATP et de GTP. La voie de récupération des purines est la plus utilisée, car moins coûteuse en énergie, et permet la production de nucléoside monophosphate par l'hypoxanthine, guanine phosphoribosyl-transférase ou par l'adénosine kinase. D'après mon travail de thèse, cette voie de récupération semble être la voie principale pour régénérer le stock des nucléotides puriques au cours de l'embryogénèse du xénope (partie I, [418]). Cependant, la perturbation de la voie *de novo* entraîne des défauts développementaux connus sous le nom de « syndrome purine » associé à une réduction de la pigmentation de l'œil et de la taille des ailes, des malformations des poils et des pattes et une létalité larvaire plus importante chez la *Drosophile* [498]. Une étude chez le poisson zèbre a montré le rôle important de cette voie, et notamment de l'ATP, dans la croissance de l'œil [497]. En effet, le mutant pour *gart* et *paics* (**figure 81**) présente une microphthalmie en raison de défauts dans le cycle cellulaire des rétino blastes en prolifération. Les individus présentent également des anomalies dans la pigmentation, mais ce phénotype est associé à la déficience en production de GTP. Pendant ma thèse, lors d'une collaboration avec l'équipe du, Pr. Daignan-Fornier, j'ai d'ailleurs participé à l'étude fonctionnelle des gènes *atic* et *adsl* (**figure 81**). J'ai généré leur profil d'expression chez *Xenopus laevis* au cours du développement, par RT-PCR et hybridation *in situ*, et initié l'étude fonctionnelle de ces gènes par la stratégie MO. Ces travaux préliminaires indiquent un rôle de ces enzymes lors de l'embryogénèse de *Xenopus laevis*. Ces résultats soulèvent l'intérêt pour l'étude de ces enzymes biochimiquement caractérisées, mais dont les fonctions embryonnaires et les mécanismes moléculaires associés restent peu connus.





En conclusion, au vu des données de la littérature et des résultats de cette thèse et de mon équipe (non publiés), l'implication des purines et de la voie de signalisation purinergique dans le développement embryonnaire des vertébrés est indiscutable [295, 499]. Il est tout à fait concevable que cette voie de signalisation soit aussi importante que les voies de signalisation Wnt, BMP, FGF, Notch et Hedgehog. Les profils d'expression spatio-temporelle des acteurs de cette voie sont distincts, dynamiques et chevauchants et suggèrent la possible implication de cette voie de signalisation à différents stades et dans différents tissus. Cependant, il est nécessaire de poursuivre les études fonctionnelles des acteurs de cette voie, et notamment celles des ectonucléotidases, régulateurs clés de cette voie. La découverte des fonctions de la voie de signalisation purinergique au cours du développement embryonnaire ouvre de nouvelles perspectives quant à la compréhension des mécanismes régulant l'embryogénèse des vertébrés.



# Références

1. Burnstock, G., *Discovery of purinergic signalling, the initial resistance and current explosion of interest*. Br J Pharmacol, 2012. **167**(2): p. 238-55.
2. Langer, D., et al., *Distribution of ectonucleotidases in the rodent brain revisited*. Cell Tissue Res, 2008. **334**(2): p. 199-217.
3. Drury, A.N. and A. Szent-Gyorgyi, *The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart*. J Physiol, 1929. **68**(3): p. 213-37.
4. Holton, P., *The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves*. J Physiol, 1959. **145**(3): p. 494-504.
5. Burnstock, G., *Purinergic nerves*. Pharmacol Rev, 1972. **24**(3): p. 509-81.
6. Burnstock, G. and C. Kennedy, *Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor?* Gen Pharmacol, 1985. **16**(5): p. 433-40.
7. Edwards, F.A., A.J. Gibb, and D. Colquhoun, *ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system*. Nature, 1992. **359**(6391): p. 144-7.
8. Lazarowski, E.R., *Vesicular and conductive mechanisms of nucleotide release*. Purinergic Signal, 2012. **8**(3): p. 359-73.
9. Sawada, K., et al., *Identification of a vesicular nucleotide transporter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(15): p. 5683-6.
10. Sabirov, R.Z. and Y. Okada, *ATP release via anion channels*. Purinergic Signal, 2005. **1**(4): p. 311-28.
11. Abbracchio, M.P. and G. Burnstock, *Purinergic signalling: pathophysiological roles*. Jpn J Pharmacol, 1998. **78**(2): p. 113-45.
12. Burnstock, G. and A. Verkhratsky, *Evolutionary origins of the purinergic signalling system*. Acta Physiol (Oxf), 2009. **195**(4): p. 415-47.
13. De Vuyst, E., et al., *Intracellular calcium changes trigger connexin 32 hemichannel opening*. EMBO J, 2006. **25**(1): p. 34-44.
14. Ambrosi, C., et al., *Pannexin1 and Pannexin2 channels show quaternary similarities to connexons and different oligomerization numbers from each other*. J Biol Chem, 2010. **285**(32): p. 24420-31.
15. Seminario-Vidal, L., et al., *Thrombin promotes release of ATP from lung epithelial cells through coordinated activation of rho- and Ca<sup>2+</sup>-dependent signaling pathways*. J Biol Chem, 2009. **284**(31): p. 20638-48.
16. Qiu, F. and G. Dahl, *A permeant regulating its permeation pore: inhibition of pannexin 1 channels by ATP*. Am J Physiol Cell Physiol, 2009. **296**(2): p. C250-5.
17. Bunse, S., et al., *The potassium channel subunit Kvbeta3 interacts with pannexin 1 and attenuates its sensitivity to changes in redox potentials*. FEBS J, 2009. **276**(21): p. 6258-70.
18. Sabirov, R.Z. and Y. Okada, *Wide nanoscopic pore of maxi-anion channel suits its function as an ATP-conductive pathway*. Biophys J, 2004. **87**(3): p. 1672-85.
19. Hisadome, K., et al., *Volume-regulated anion channels serve as an auto/paracrine nucleotide release pathway in aortic endothelial cells*. J Gen Physiol, 2002. **119**(6): p. 511-20.
20. Okada, Y., *Volume expansion-sensing outward-rectifier Cl<sup>-</sup> channel: fresh start to the molecular identity and volume sensor*. Am J Physiol, 1997. **273**(3 Pt 1): p. C755-89.
21. Schwiebert, E.M., *ABC transporter-facilitated ATP conductive transport*. Am J Physiol, 1999. **276**(1 Pt 1): p. C1-8.
22. Gualix, J., J. Pintor, and M.T. Miras-Portugal, *Characterization of nucleotide transport into rat brain synaptic vesicles*. J Neurochem, 1999. **73**(3): p. 1098-104.
23. Robson, S.C., J. Sevigny, and H. Zimmermann, *The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance*. Purinergic Signal, 2006. **2**(2): p. 409-30.
24. Zimmermann, H., M. Zebisch, and N. Sträter, *Cellular function and molecular structure of ectonucleotidases*. Purinergic Signal, 2012. **8**(3): p. 437-502.
25. Stefan, C., S. Jansen, and M. Bollen, *Modulation of purinergic signaling by NPP-type ectophosphodiesterases*. Purinergic Signal, 2006. **2**(2): p. 361-70.

26. Heine, P., et al., *Functional characterization of rat ecto-ATPase and ecto-ATP diphosphohydrolase after heterologous expression in CHO cells*. Eur J Biochem, 1999. **262**(1): p. 102-7.
27. Chadwick, B.P. and A.M. Frischauf, *The CD39-like gene family: identification of three new human members (CD39L2, CD39L3, and CD39L4), their murine homologues, and a member of the gene family from Drosophila melanogaster*. Genomics, 1998. **50**(3): p. 357-67.
28. Bigonnesse, F., et al., *Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8*. Biochemistry, 2004. **43**(18): p. 5511-9.
29. Goepfert, C., et al., *Disordered cellular migration and angiogenesis in cd39-null mice*. Circulation, 2001. **104**(25): p. 3109-15.
30. Feng, L., et al., *Vascular CD39/ENTPD1 directly promotes tumor cell growth by scavenging extracellular adenosine triphosphate*. Neoplasia, 2011. **13**(3): p. 206-16.
31. Levesque, S.A., et al., *NTPDase1 governs P2X7-dependent functions in murine macrophages*. Eur J Immunol, 2010. **40**(5): p. 1473-85.
32. Deaglio, S., et al., *Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression*. J Exp Med, 2007. **204**(6): p. 1257-65.
33. Goding, J.W., B. Grobben, and H. Slegers, *Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1638**(1): p. 1-19.
34. Perrakis, A. and W.H. Moolenaar, *Autotaxin: structure-function and signaling*. J Lipid Res, 2014. **55**(6): p. 1010-1018.
35. Yegutkin, G.G., *Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1783**(5): p. 673-94.
36. Yegutkin, G.G., T. Henttinen, and S. Jalkanen, *Extracellular ATP formation on vascular endothelial cells is mediated by ecto-nucleotide kinase activities via phosphotransfer reactions*. FASEB J, 2001. **15**(1): p. 251-260.
37. Mehta, A. and S. Orchard, *Nucleoside diphosphate kinase (NDPK, NM23, AWD): recent regulatory advances in endocytosis, metastasis, psoriasis, insulin release, fetal erythroid lineage and heart failure; translational medicine exemplified*. Mol Cell Biochem, 2009. **329**(1-2): p. 3-15.
38. Bilitou, A., et al., *The NM23 family in development*. Mol Cell Biochem, 2009. **329**(1-2): p. 17-33.
39. Takacs-Vellai, K., *The metastasis suppressor Nm23 as a modulator of Ras/ERK signaling*. J Mol Signal, 2014. **9**: p. 4.
40. Boissan, M., et al., *Membrane trafficking. Nucleoside diphosphate kinases fuel dynamin superfamily proteins with GTP for membrane remodeling*. Science, 2014. **344**(6191): p. 1510-5.
41. Okabe-Kado, J., T. Kasukabe, and Y. Kaneko, *Extracellular NM23 Protein as a Therapeutic Target for Hematologic Malignancies*. Adv Hematol, 2012. **2012**: p. 879368.
42. Boyer, P.D., *The ATP synthase--a splendid molecular machine*. Annu Rev Biochem, 1997. **66**: p. 717-49.
43. Moser, T.L., et al., *Endothelial cell surface F1-F0 ATP synthase is active in ATP synthesis and is inhibited by angiostatin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(12): p. 6656-61.
44. Kim, B.W., et al., *Extracellular ATP is generated by ATP synthase complex in adipocyte lipid rafts*. Exp Mol Med, 2004. **36**(5): p. 476-85.
45. Burrell, H.E., et al., *Human keratinocytes release ATP and utilize three mechanisms for nucleotide interconversion at the cell surface*. J Biol Chem, 2005. **280**(33): p. 29667-76.
46. Chi, S.L. and S.V. Pizzo, *Angiostatin is directly cytotoxic to tumor cells at low extracellular pH: a mechanism dependent on cell surface-associated ATP synthase*. Cancer Res, 2006. **66**(2): p. 875-82.
47. Champagne, E., et al., *Ecto-F1Fo ATP synthase/F1 ATPase: metabolic and immunological functions*. Curr Opin Lipidol, 2006. **17**(3): p. 279-84.
48. Xing, S., et al., *Regulation of neuronal toxicity of beta-amyloid oligomers by surface ATP synthase*. Mol Med Rep, 2013. **8**(6): p. 1689-94.

49. Kawai, Y., et al., *Cell surface F1/FO ATP synthase contributes to interstitial flow-mediated development of the acidic microenvironment in tumor tissues*. Am J Physiol Cell Physiol, 2013. **305**(11): p. C1139-50.
50. Janssen, E., et al., *Two structurally distinct and spatially compartmentalized adenylate kinases are expressed from the AK1 gene in mouse brain*. Mol Cell Biochem, 2004. **256-257**(1-2): p. 59-72.
51. Sperlagh, B. and E.S. Vizi, *Extracellular interconversion of nucleotides reveals an ecto-adenylate kinase activity in the rat hippocampus*. Neurochem Res, 2007. **32**(11): p. 1978-89.
52. Picher, M. and R.C. Boucher, *Human airway ecto-adenylate kinase. A mechanism to propagate ATP signaling on airway surfaces*. J Biol Chem, 2003. **278**(13): p. 11256-64.
53. Yegutkin, G.G., et al., *The evidence for two opposite, ATP-generating and ATP-consuming, extracellular pathways on endothelial and lymphoid cells*. Biochem J, 2002. **367**(Pt 1): p. 121-8.
54. Burnstock, G., *Purine and pyrimidine receptors*. Cell Mol Life Sci, 2007. **64**(12): p. 1471-83.
55. Murrell-Lagnado, R.D. and O.S. Qureshi, *Assembly and trafficking of P2X purinergic receptors (Review)*. Mol Membr Biol, 2008. **25**(4): p. 321-31.
56. Jacobson, K.A., et al., *G protein-coupled adenosine (P1) and P2Y receptors: ligand design and receptor interactions*. Purinergic Signal, 2012. **8**(3): p. 419-36.
57. Burnstock, G. and I. Novak, *Purinergic signalling and diabetes*. Purinergic Signal, 2013. **9**(3): p. 307-24.
58. White, N. and G. Burnstock, *P2 receptors and cancer*. Trends Pharmacol Sci, 2006. **27**(4): p. 211-7.
59. Burnstock, G., B.B. Fredholm, and A. Verkhratsky, *Adenosine and ATP receptors in the brain*. Curr Top Med Chem, 2011. **11**(8): p. 973-1011.
60. Burnstock, G., *Purinergic signalling and disorders of the central nervous system*. Nat Rev Drug Discov, 2008. **7**(7): p. 575-90.
61. Burnstock, G., *Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(3): p. 364-73.
62. Hou, M., et al., *Increase in cardiac P2X1- and P2Y2-receptor mRNA levels in congestive heart failure*. Life Sci, 1999. **65**(11): p. 1195-206.
63. Agrawal, A., et al., *The effects of P2X7 receptor antagonists on the formation and function of human osteoclasts in vitro*. Purinergic Signal, 2010. **6**(3): p. 307-15.
64. Salvatore, C.A., et al., *Molecular cloning and characterization of the human A3 adenosine receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(21): p. 10365-9.
65. Libert, F., et al., *Selective amplification and cloning of four new members of the G protein-coupled receptor family*. Science, 1989. **244**(4904): p. 569-72.
66. Lebon, G., et al., *Agonist-bound adenosine A2A receptor structures reveal common features of GPCR activation*. Nature, 2011. **474**(7352): p. 521-5.
67. Costanzi, S., et al., *Rhodopsin and the others: a historical perspective on structural studies of G protein-coupled receptors*. Curr Pharm Des, 2009. **15**(35): p. 3994-4002.
68. Jaakola, V.P., et al., *The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist*. Science, 2008. **322**(5905): p. 1211-7.
69. Dore, A.S., et al., *Structure of the adenosine A(2A) receptor in complex with ZM241385 and the xanthines XAC and caffeine*. Structure, 2011. **19**(9): p. 1283-93.
70. Jacobson, K.A., *Introduction to adenosine receptors as therapeutic targets*. Handb Exp Pharmacol, 2009(193): p. 1-24.
71. Sheth, S., et al., *Adenosine receptors: expression, function and regulation*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(2): p. 2024-52.
72. Fredholm, B.B., et al., *International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update*. Pharmacol Rev, 2011. **63**(1): p. 1-34.
73. Dixon, A.K., et al., *Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat*. Br J Pharmacol, 1996. **118**(6): p. 1461-8.
74. Ren, H. and G.L. Stiles, *Characterization of the human A1 adenosine receptor gene. Evidence for alternative splicing*. J Biol Chem, 1994. **269**(4): p. 3104-10.

75. Peterfreund, R.A., et al., *Characterization and expression of the human A2a adenosine receptor gene*. J Neurochem, 1996. **66**(1): p. 362-8.
76. Meng, F., et al., *Cloning and characterization of a pharmacologically distinct A1 adenosine receptor from guinea pig brain*. Brain Res Mol Brain Res, 1994. **26**(1-2): p. 143-55.
77. Knapp, K., et al., *Crystal structure of the human ecto-5'-nucleotidase (CD73): insights into the regulation of purinergic signaling*. Structure, 2012. **20**(12): p. 2161-73.
78. Zimmermann, H., *5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects*. Biochem J, 1992. **285** ( Pt 2): p. 345-65.
79. Knofel, T. and N. Strater, *X-ray structure of the Escherichia coli periplasmic 5'-nucleotidase containing a dimetal catalytic site*. Nat Struct Biol, 1999. **6**(5): p. 448-53.
80. Wallden, K., et al., *Crystal structure of human cytosolic 5'-nucleotidase II: insights into allosteric regulation and substrate recognition*. J Biol Chem, 2007. **282**(24): p. 17828-36.
81. Fini, C., et al., *Biochemical and mass spectrometric characterization of soluble ecto-5'-nucleotidase from bull seminal plasma*. Biochem J, 2003. **372**(Pt 2): p. 443-51.
82. Vogel, M., et al., *Soluble low-Km 5'-nucleotidase from electric-ray (Torpedo marmorata) electric organ and bovine cerebral cortex is derived from the glycosyl-phosphatidylinositol-anchored ectoenzyme by phospholipase C cleavage*. Biochem J, 1992. **284** ( Pt 3): p. 621-4.
83. Martin-Satue, M., et al., *High expression and activity of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in the male murine reproductive tract*. Histochem Cell Biol, 2010. **133**(6): p. 659-68.
84. Thompson, L.F., et al., *Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia*. J Exp Med, 2004. **200**(11): p. 1395-405.
85. Sadej, R. and A.C. Skladanowski, *Dual, enzymatic and non-enzymatic, function of ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) in migration and invasion of A375 melanoma cells*. Acta Biochim Pol, 2012. **59**(4): p. 647-52.
86. Resta, R. and L.F. Thompson, *T cell signalling through CD73*. Cell Signal, 1997. **9**(2): p. 131-9.
87. Airas, L., et al., *Differential regulation and function of CD73, a glycosyl-phosphatidylinositol-linked 70-kD adhesion molecule, on lymphocytes and endothelial cells*. J Cell Biol, 1997. **136**(2): p. 421-31.
88. Airas, L., J. Niemela, and S. Jalkanen, *CD73 engagement promotes lymphocyte binding to endothelial cells via a lymphocyte function-associated antigen-1-dependent mechanism*. J Immunol, 2000. **165**(10): p. 5411-7.
89. Airas, L. and S. Jalkanen, *CD73 mediates adhesion of B cells to follicular dendritic cells*. Blood, 1996. **88**(5): p. 1755-64.
90. Mehul, B., et al., *Dual mechanism of laminin modulation of ecto-5'-nucleotidase activity*. J Cell Biochem, 1993. **52**(3): p. 266-74.
91. Olmo, N., et al., *Modulation of 5'-nucleotidase activity in plasma membranes and intact cells by the extracellular matrix proteins laminin and fibronectin*. Biochem J, 1992. **282** ( Pt 1): p. 181-8.
92. Stec, B., K.M. Holtz, and E.R. Kantrowitz, *A revised mechanism for the alkaline phosphatase reaction involving three metal ions*. J Mol Biol, 2000. **299**(5): p. 1303-11.
93. Le Du, M.H., et al., *Crystal structure of alkaline phosphatase from human placenta at 1.8 Å resolution. Implication for a substrate specificity*. J Biol Chem, 2001. **276**(12): p. 9158-65.
94. Le Du, M.H. and J.L. Millan, *Structural evidence of functional divergence in human alkaline phosphatases*. J Biol Chem, 2002. **277**(51): p. 49808-14.
95. Millan, J.L., *Alkaline Phosphatases : Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes*. Purinergic Signal, 2006. **2**(2): p. 335-41.
96. Nosjean, O., et al., *Human tissue non-specific alkaline phosphatases: sugar-moiety-induced enzymic and antigenic modulations and genetic aspects*. Biochem J, 1997. **321** ( Pt 2): p. 297-303.
97. Kuwana, T., O. Sugita, and M. Yakata, *Sugar chain heterogeneity of bone and liver alkaline phosphatase in serum*. Enzyme, 1991. **45**(1-2): p. 63-6.
98. Hoylaerts, M.F., et al., *Mammalian alkaline phosphatase catalysis requires active site structure stabilization via the N-terminal amino acid microenvironment*. Biochemistry, 2006. **45**(32): p. 9756-66.

99. Kozlenkov, A., et al., *Residues determining the binding specificity of uncompetitive inhibitors to tissue-nonspecific alkaline phosphatase*. J Bone Miner Res, 2004. **19**(11): p. 1862-72.
100. Hoylaerts, M.F., T. Manes, and J.L. Millan, *Mammalian alkaline phosphatases are allosteric enzymes*. J Biol Chem, 1997. **272**(36): p. 22781-7.
101. Low, M.G. and J.B. Finean, *Release of alkaline phosphatase from membranes by a phosphatidylinositol-specific phospholipase C*. Biochem J, 1977. **167**(1): p. 281-4.
102. Schwartz, J.H. and F. Lipmann, *Phosphate incorporation into alkaline phosphatase of E. coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1961. **47**: p. 1996-2005.
103. Llinas, P., et al., *Structural studies of human placental alkaline phosphatase in complex with functional ligands*. J Mol Biol, 2005. **350**(3): p. 441-51.
104. Moss, D.W., F.D. Raymond, and D.B. Wile, *Clinical and biological aspects of acid phosphatase*. Crit Rev Clin Lab Sci, 1995. **32**(4): p. 431-67.
105. Wilson, P.D., G.P. Smith, and T.J. Peters, *Pyridoxal 5'-phosphate: a possible physiological substrate for alkaline phosphatase in human neutrophils*. Histochem J, 1983. **15**(3): p. 257-64.
106. Farley, J.R., et al., *Monofluorophosphate is hydrolyzed by alkaline phosphatase and mimics the actions of NaF on skeletal tissues, in vitro*. Calcif Tissue Int, 1987. **40**(1): p. 35-42.
107. Lorenz, B. and H.C. Schroder, *Mammalian intestinal alkaline phosphatase acts as highly active exopolyphosphatase*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1547**(2): p. 254-61.
108. Sumikawa, K., T. Okochi, and K. Adachi, *Differences in phosphatidate hydrolytic activity of human alkaline phosphatase isozymes*. Biochim Biophys Acta, 1990. **1046**(1): p. 27-31.
109. Ciancaglini, P., et al., *Kinetic analysis of substrate utilization by native and TNAP-, NPP1-, or PHOSPHO1-deficient matrix vesicles*. J Bone Miner Res, 2010. **25**(4): p. 716-23.
110. Say, J.C., et al., *Alkaline phosphatase from rat osseous plates: purification and biochemical characterization of a soluble form*. Biochim Biophys Acta, 1991. **1074**(2): p. 256-62.
111. Poelstra, K., et al., *A physiologic function for alkaline phosphatase: endotoxin detoxification*. Lab Invest, 1997. **76**(3): p. 319-27.
112. Mornet, E., *Hypophosphatasia*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2008. **22**(1): p. 113-27.
113. Mornet, E., et al., *Structural evidence for a functional role of human tissue nonspecific alkaline phosphatase in bone mineralization*. J Biol Chem, 2001. **276**(33): p. 31171-8.
114. Meyer, J.L., *Can biological calcification occur in the presence of pyrophosphate?* Arch Biochem Biophys, 1984. **231**(1): p. 1-8.
115. Rezende, A.A., et al., *Phosphodiesterase activity is a novel property of alkaline phosphatase from osseous plate*. Biochem J, 1994. **301** ( Pt 2): p. 517-22.
116. Nunes, M.L., et al., *Pyridoxine-dependent seizures associated with hypophosphatasia in a newborn*. J Child Neurol, 2002. **17**(3): p. 222-4.
117. Waymire, K.G., et al., *Mice lacking tissue non-specific alkaline phosphatase die from seizures due to defective metabolism of vitamin B-6*. Nat Genet, 1995. **11**(1): p. 45-51.
118. Bates, J.M., et al., *Intestinal alkaline phosphatase detoxifies lipopolysaccharide and prevents inflammation in zebrafish in response to the gut microbiota*. Cell Host Microbe, 2007. **2**(6): p. 371-82.
119. Geddes, K. and D.J. Philpott, *A new role for intestinal alkaline phosphatase in gut barrier maintenance*. Gastroenterology, 2008. **135**(1): p. 8-12.
120. Malo, M.S., et al., *Intestinal alkaline phosphatase preserves the normal homeostasis of gut microbiota*. Gut, 2010. **59**(11): p. 1476-84.
121. Lynes, M.D. and E.P. Widmaier, *Involvement of CD36 and intestinal alkaline phosphatases in fatty acid transport in enterocytes, and the response to a high-fat diet*. Life Sci, 2011. **88**(9-10): p. 384-91.
122. Bossi, M., M.F. Hoylaerts, and J.L. Millan, *Modifications in a flexible surface loop modulate the isozyme-specific properties of mammalian alkaline phosphatases*. J Biol Chem, 1993. **268**(34): p. 25409-16.
123. Vittur, F., et al., *Alkaline phosphatase binds to collagen; a hypothesis on the mechanism of extravesicular mineralization in epiphyseal cartilage*. Experientia, 1984. **40**(8): p. 836-7.
124. Makiya, R. and T. Stigbrand, *Placental alkaline phosphatase has a binding site for the human immunoglobulin-G Fc portion*. Eur J Biochem, 1992. **205**(1): p. 341-5.



125. Shirley, D.G., R.M. Vekaria, and J. Sevigny, *Ectonucleotidases in the kidney*. Purinergic Signal, 2009. **5**(4): p. 501-11.
126. Pease, S., et al., *Isolation of embryonic stem (ES) cells in media supplemented with recombinant leukemia inhibitory factor (LIF)*. Dev Biol, 1990. **141**(2): p. 344-52.
127. Heath, J.K., *Characterization of a xenogeneic antiserum raised against the fetal germ cells of the mouse: cross-reactivity with embryonal carcinoma cells*. Cell, 1978. **15**(1): p. 299-306.
128. Langer, D., et al., *The ectonucleotidases alkaline phosphatase and nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2 are associated with subsets of progenitor cell populations in the mouse embryonic, postnatal and adult neurogenic zones*. Neuroscience, 2007. **150**(4): p. 863-79.
129. Millan, J.L., *Alkaline phosphatase as a reporter of cancerous transformation*. Clin Chim Acta, 1992. **209**(1-2): p. 123-9.
130. Kermer, V., et al., *Knockdown of tissue nonspecific alkaline phosphatase impairs neural stem cell proliferation and differentiation*. Neurosci Lett, 2010. **485**(3): p. 208-11.
131. Brun-Heath, I., et al., *Differential expression of the bone and the liver tissue non-specific alkaline phosphatase isoforms in brain tissues*. Cell Tissue Res, 2011. **343**(3): p. 521-36.
132. Domar, U., et al., *Expression of intestinal alkaline phosphatase in human organs*. Histochemistry, 1992. **98**(6): p. 359-364.
133. Ortlund, E., M.W. LaCount, and L. Lebioda, *Crystal structures of human prostatic acid phosphatase in complex with a phosphate ion and alpha-benzylaminobenzylphosphonic acid update the mechanistic picture and offer new insights into inhibitor design*. Biochemistry, 2003. **42**(2): p. 383-9.
134. Ostanin, K., A. Saeed, and R.L. Van Etten, *Heterologous expression of human prostatic acid phosphatase and site-directed mutagenesis of the enzyme active site*. J Biol Chem, 1994. **269**(12): p. 8971-8.
135. Pohlmann, R., et al., *Human lysosomal acid phosphatase: cloning, expression and chromosomal assignment*. EMBO J, 1988. **7**(8): p. 2343-50.
136. Yousef, G.M., et al., *Molecular cloning of a novel human acid phosphatase gene (ACPT) that is highly expressed in the testis*. Genomics, 2001. **74**(3): p. 385-95.
137. Muniyan, S., et al., *Human prostatic Acid phosphatase: structure, function and regulation*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(5): p. 10438-64.
138. Zylka, M.J., et al., *Prostatic acid phosphatase is an ectonucleotidase and suppresses pain by generating adenosine*. Neuron, 2008. **60**(1): p. 111-22.
139. Vihko, P., *Characterization of the principal human prostatic acid phosphatase isoenzyme, purified by affinity chromatography and isoelectric focusing. Part II*. Clin Chem, 1978. **24**(10): p. 1783-87.
140. Silverman, J.D. and L. Kruger, *Acid phosphatase as a selective marker for a class of small sensory ganglion cells in several mammals: spinal cord distribution, histochemical properties, and relation to fluoride-resistant acid phosphatase (FRAP) of rodents*. Somatosens Res, 1988. **5**(3): p. 219-46.
141. Jakob, C.G., et al., *Crystal structure of human prostatic acid phosphatase*. Prostate, 2000. **42**(3): p. 211-8.
142. Quintero, I.B., et al., *Prostatic acid phosphatase is not a prostate specific target*. Cancer Res, 2007. **67**(14): p. 6549-54.
143. Nousiainen, H.O., et al., *Mice deficient in transmembrane prostatic acid phosphatase display increased GABAergic transmission and neurological alterations*. PLoS One, 2014. **9**(5): p. e97851.
144. Franco, R., et al., *Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes*. Immunol Rev, 1998. **161**: p. 27-42.
145. Pacheco, R., et al., *CD26, adenosine deaminase, and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(27): p. 9583-8.
146. Blackburn, M.R. and R.E. Kellems, *Adenosine deaminase deficiency: metabolic basis of immune deficiency and pulmonary inflammation*. Adv Immunol, 2005. **86**: p. 1-41.
147. Sideraki, V., et al., *Probing the functional role of two conserved active site aspartates in mouse adenosine deaminase*. Biochemistry, 1996. **35**(24): p. 7862-72.

148. Niu, W., et al., *The role of Zn<sup>2+</sup> on the structure and stability of murine adenosine deaminase*. J Phys Chem B, 2010. **114**(49): p. 16156-65.
149. Nagano, N., C.A. Orengo, and J.M. Thornton, *One fold with many functions: the evolutionary relationships between TIM barrel families based on their sequences, structures and functions*. J Mol Biol, 2002. **321**(5): p. 741-65.
150. Van der Weyden, M.B. and W.N. Kelley, *Human adenosine deaminase. Distribution and properties*. J Biol Chem, 1976. **251**(18): p. 5448-56.
151. Chinsky, J.M., et al., *Adenosine deaminase gene expression. Tissue-dependent regulation of transcriptional elongation*. J Biol Chem, 1989. **264**(24): p. 14561-5.
152. Bzowska, A., E. Kulikowska, and D. Shugar, *Purine nucleoside phosphorylases: properties, functions, and clinical aspects*. Pharmacol Ther, 2000. **88**(3): p. 349-425.
153. de Azevedo, W.F., Jr., et al., *Crystal structure of human purine nucleoside phosphorylase at 2.3 Å resolution*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **308**(3): p. 545-52.
154. Canduri, F., et al., *Structures of human purine nucleoside phosphorylase complexed with inosine and dIdI*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **313**(4): p. 907-14.
155. de Azevedo, W.F., Jr., et al., *Crystal structure of human PNP complexed with guanine*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **312**(3): p. 767-72.
156. Cohen, A., et al., *IMMUNODEFICIENCY CAUSED BY PURINE NUCLEOSIDE PHOSPHORYLASE DEFICIENCY*. Immunology and Allergy Clinics of North America, 2000. **20**(1): p. 143-159.
157. Park, J. and R.S. Gupta, *Adenosine kinase and ribokinase--the RK family of proteins*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(18): p. 2875-96.
158. Boison, D., *Adenosine kinase: exploitation for therapeutic gain*. Pharmacol Rev, 2013. **65**(3): p. 906-43.
159. Mathews, II, M.D. Erion, and S.E. Ealick, *Structure of human adenosine kinase at 1.5 Å resolution*. Biochemistry, 1998. **37**(45): p. 15607-20.
160. Chang, C.H., R.W. Brockman, and L.L. Bennett, Jr., *Adenosine kinase from LI210 cells. Purification and some properties of the enzyme*. J Biol Chem, 1980. **255**(6): p. 2366-71.
161. Bennett, L.L., Jr. and D.L. Hill, *Structural requirements for activity of nucleosides as substrates for adenosine kinase: orientation of substituents on the pentofuranosyl ring*. Mol Pharmacol, 1975. **11**(6): p. 803-8.
162. Wiesner, J.B., et al., *Adenosine kinase inhibitors as a novel approach to anticonvulsant therapy*. J Pharmacol Exp Ther, 1999. **289**(3): p. 1669-77.
163. Palella, T.D., C.M. Andres, and I.H. Fox, *Human placental adenosine kinase. Kinetic mechanism and inhibition*. J Biol Chem, 1980. **255**(11): p. 5264-9.
164. Cui, X.A., et al., *Subcellular localization of adenosine kinase in mammalian cells: The long isoform of AdK is localized in the nucleus*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **388**(1): p. 46-50.
165. Hille, R. and T. Nishino, *Flavoprotein structure and mechanism. 4. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase*. FASEB J, 1995. **9**(11): p. 995-1003.
166. Crane, J.K., *Role of host xanthine oxidase in infection due to enteropathogenic and Shiga-toxigenic Escherichia coli*. Gut Microbes, 2013. **4**(5): p. 388-91.
167. Enroth, C., et al., *Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(20): p. 10723-8.
168. Wang, J., et al., *Serum xanthine oxidase: origin, regulation, and contribution to control of trypanosome parasitemia*. Antioxid Redox Signal, 2002. **4**(1): p. 161-78.
169. Battelli, M.G., A. Bolognesi, and L. Polito, *Pathophysiology of circulating xanthine oxidoreductase: New emerging roles for a multi-tasking enzyme*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1842**(9): p. 1502-1517.
170. Danielyan, K.E., *Dependence of cell survival on correlative activities of xanthine oxidase and dihydropyrimidine dehydrogenase in human brain-derived cell culture*. Cent Nerv Syst Agents Med Chem, 2013. **13**(2): p. 108-13.
171. Furukawa, S., et al., *Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome*. J Clin Invest, 2004. **114**(12): p. 1752-61.

172. Palmieri, V.O., et al., *Systemic oxidative alterations are associated with visceral adiposity and liver steatosis in patients with metabolic syndrome*. J Nutr, 2006. **136**(12): p. 3022-6.
173. Linder, N., et al., *Decreased xanthine oxidoreductase (XOR) is associated with a worse prognosis in patients with serous ovarian carcinoma*. Gynecol Oncol, 2012. **124**(2): p. 311-8.
174. Young, J.D., et al., *The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29*. Mol Aspects Med, 2013. **34**(2-3): p. 529-47.
175. Damaraju, V.L., et al., *Interaction of fused-pyrimidine nucleoside analogs with human concentrative nucleoside transporters: High-affinity inhibitors of human concentrative nucleoside transporter 1*. Biochem Pharmacol, 2011. **81**(1): p. 82-90.
176. Johnson, Z.L., C.G. Cheong, and S.Y. Lee, *Crystal structure of a concentrative nucleoside transporter from Vibrio cholerae at 2.4 Å*. Nature, 2012. **483**(7390): p. 489-93.
177. Parkinson, F.E., et al., *Molecular biology of nucleoside transporters and their distributions and functions in the brain*. Curr Top Med Chem, 2011. **11**(8): p. 948-72.
178. Loewen, S.K., et al., *Identification of amino acid residues responsible for the pyrimidine and purine nucleoside specificities of human concentrative Na<sup>+</sup> nucleoside cotransporters hCNT1 and hCNT2*. J Biol Chem, 1999. **274**(35): p. 24475-84.
179. Wang, J. and K.M. Giacomini, *Molecular determinants of substrate selectivity in Na<sup>+</sup>-dependent nucleoside transporters*. J Biol Chem, 1997. **272**(46): p. 28845-8.
180. Hamilton, S.R., et al., *Subcellular distribution and membrane topology of the mammalian concentrative Na<sup>+</sup>-nucleoside cotransporter rCNT1*. J Biol Chem, 2001. **276**(30): p. 27981-8.
181. Baldwin, S.A., et al., *The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29*. Pflugers Arch, 2004. **447**(5): p. 735-43.
182. Smith, K.M., et al., *The broadly selective human Na<sup>+</sup>/nucleoside cotransporter (hCNT3) exhibits novel cation-coupled nucleoside transport characteristics*. J Biol Chem, 2005. **280**(27): p. 25436-49.
183. Pennycooke, M., et al., *Differential expression of human nucleoside transporters in normal and tumor tissue*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **280**(3): p. 951-9.
184. Ritzel, M.W., et al., *Molecular identification and characterization of novel human and mouse concentrative Na<sup>+</sup>-nucleoside cotransporter proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system cib)*. J Biol Chem, 2001. **276**(4): p. 2914-27.
185. Barnes, K., et al., *Distribution and functional characterization of equilibrative nucleoside transporter-4, a novel cardiac adenosine transporter activated at acidic pH*. Circ Res, 2006. **99**(5): p. 510-9.
186. Podgorska, M., K. Kocbuch, and T. Pawelczyk, *Recent advances in studies on biochemical and structural properties of equilibrative and concentrative nucleoside transporters*. Acta Biochim Pol, 2005. **52**(4): p. 749-58.
187. Errasti-Murugarren, E., et al., *A splice variant of the SLC28A3 gene encodes a novel human concentrative nucleoside transporter-3 (hCNT3) protein localized in the endoplasmic reticulum*. FASEB J, 2009. **23**(1): p. 172-82.
188. Baldwin, S.A., et al., *Functional characterization of novel human and mouse equilibrative nucleoside transporters (hENT3 and mENT3) located in intracellular membranes*. J Biol Chem, 2005. **280**(16): p. 15880-7.
189. Govindarajan, R., et al., *Facilitated mitochondrial import of antiviral and anticancer nucleoside drugs by human equilibrative nucleoside transporter-3*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009. **296**(4): p. G910-22.
190. Burnstock, G., et al., *Purinergic signalling: from normal behaviour to pathological brain function*. Prog Neurobiol, 2011. **95**(2): p. 229-74.
191. Junger, W.G., *Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(3): p. 201-12.
192. Antonioli, L., et al., *CD39 and CD73 in immunity and inflammation*. Trends Mol Med, 2013. **19**(6): p. 355-67.
193. Ribeiro, J.A. and A.M. Sebastiao, *Caffeine and adenosine*. J Alzheimers Dis, 2010. **20 Suppl 1**: p. S3-15.
194. Burnstock, G., B. Vaughn, and S.C. Robson, *Purinergic signalling in the liver in health and disease*. Purinergic Signal, 2013.

195. Burnstock, G., L.C. Evans, and M.A. Bailey, *Purinergic signalling in the kidney in health and disease*. Purinergic Signal, 2013.
196. Glaser, T., et al., *Perspectives of purinergic signaling in stem cell differentiation and tissue regeneration*. Purinergic Signal, 2012. **8**(3): p. 523-37.
197. Spychala, J., *Tumor-promoting functions of adenosine*. Pharmacol Ther, 2000. **87**(2-3): p. 161-73.
198. Di Virgilio, F., *Purines, purinergic receptors, and cancer*. Cancer Res, 2012. **72**(21): p. 5441-7.
199. Snyder, S.H., *Adenosine as a neuromodulator*. Annu Rev Neurosci, 1985. **8**: p. 103-24.
200. Dunwiddie, T.V. and S.A. Masino, *The role and regulation of adenosine in the central nervous system*. Annu Rev Neurosci, 2001. **24**: p. 31-55.
201. Baines, A.E., et al., *Differential trafficking of adenosine receptors in hippocampal neurons monitored using GFP- and super-ecliptic pHluorin-tagged receptors*. Neuropharmacology, 2011. **61**(1-2): p. 1-11.
202. Wall, M. and N. Dale, *Activity-dependent release of adenosine: a critical re-evaluation of mechanism*. Curr Neuropharmacol, 2008. **6**(4): p. 329-37.
203. Stone, T.W., S. Ceruti, and M.P. Abbracchio, *Adenosine receptors and neurological disease: neuroprotection and neurodegeneration*. Handb Exp Pharmacol, 2009(193): p. 535-87.
204. Basheer, R., et al., *Adenosine and sleep-wake regulation*. Prog Neurobiol, 2004. **73**(6): p. 379-96.
205. Porkka-Heiskanen, T., et al., *Adenosine and sleep*. Sleep Med Rev, 2002. **6**(4): p. 321-32.
206. Huston, J.P., et al., *Extracellular adenosine levels in neostriatum and hippocampus during rest and activity periods of rats*. Neuroscience, 1996. **73**(1): p. 99-107.
207. Palchykova, S., et al., *Manipulation of adenosine kinase affects sleep regulation in mice*. J Neurosci, 2010. **30**(39): p. 13157-65.
208. Radek, R.J., M.W. Decker, and M.F. Jarvis, *The adenosine kinase inhibitor ABT-702 augments EEG slow waves in rats*. Brain Res, 2004. **1026**(1): p. 74-83.
209. Okada, T., et al., *Dominant localization of adenosine deaminase in leptomeninges and involvement of the enzyme in sleep*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **312**(1): p. 29-34.
210. Retey, J.V., et al., *A functional genetic variation of adenosine deaminase affects the duration and intensity of deep sleep in humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(43): p. 15676-81.
211. Ledent, C., et al., *Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor*. Nature, 1997. **388**(6643): p. 674-8.
212. Johansson, B., et al., *Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A1 receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(16): p. 9407-12.
213. Chen, J., et al., *The type 1 equilibrative nucleoside transporter regulates anxiety-like behavior in mice*. Genes Brain Behav, 2007. **6**(8): p. 776-83.
214. Kaster, M.P., et al., *Adenosine administration produces an antidepressant-like effect in mice: evidence for the involvement of A1 and A2A receptors*. Neurosci Lett, 2004. **355**(1-2): p. 21-4.
215. Regateiro, F.S., S.P. Cobbold, and H. Waldmann, *CD73 and adenosine generation in the creation of regulatory microenvironments*. Clin Exp Immunol, 2013. **171**(1): p. 1-7.
216. Hua, X., et al., *Enhanced mast cell activation in mice deficient in the A2b adenosine receptor*. J Exp Med, 2007. **204**(1): p. 117-28.
217. Linden, J. and C. Cekic, *Regulation of lymphocyte function by adenosine*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(9): p. 2097-103.
218. Yang, D., et al., *The A2B adenosine receptor protects against inflammation and excessive vascular adhesion*. J Clin Invest, 2006. **116**(7): p. 1913-23.
219. Salvatore, C.A., et al., *Disruption of the A(3) adenosine receptor gene in mice and its effect on stimulated inflammatory cells*. J Biol Chem, 2000. **275**(6): p. 4429-34.
220. Snyder, F.F., et al., *Point mutations at the purine nucleoside phosphorylase locus impair thymocyte differentiation in the mouse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(6): p. 2522-7.
221. Rodriguez-Mulero, S., et al., *Expression of concentrative nucleoside transporters SLC28 (CNT1, CNT2, and CNT3) along the rat nephron: effect of diabetes*. Kidney Int, 2005. **68**(2): p. 665-72.

222. Vallon, V., B. Muhlbauer, and H. Osswald, *Adenosine and kidney function*. *Physiol Rev*, 2006. **86**(3): p. 901-40.
223. Li, L., et al., *Tubuloglomerular feedback and renal function in mice with targeted deletion of the type 1 equilibrative nucleoside transporter*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013. **304**(4): p. F382-9.
224. Carlstrom, M., C.S. Wilcox, and W.J. Welch, *Adenosine A(2) receptors modulate tubuloglomerular feedback*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2010. **299**(2): p. F412-7.
225. Sun, D., et al., *Mediation of tubuloglomerular feedback by adenosine: evidence from mice lacking adenosine 1 receptors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(17): p. 9983-8.
226. Castrop, H., et al., *Impairment of tubuloglomerular feedback regulation of GFR in ecto-5'-nucleotidase/CD73-deficient mice*. *J Clin Invest*, 2004. **114**(5): p. 634-42.
227. Huang, D.Y., et al., *Ecto-5'-nucleotidase (cd73)-dependent and -independent generation of adenosine participates in the mediation of tubuloglomerular feedback in vivo*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006. **291**(2): p. F282-8.
228. Hansen, P.B., et al., *Vasoconstrictor and vasodilator effects of adenosine in the mouse kidney due to preferential activation of A1 or A2 adenosine receptors*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005. **315**(3): p. 1150-7.
229. Ortiz-Capisano, M.C., et al., *Adenosine inhibits renin release from juxtaglomerular cells via an A1 receptor-TRPC-mediated pathway*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013. **305**(8): p. F1209-19.
230. Weaver, D.R. and S.M. Reppert, *Adenosine receptor gene expression in rat kidney*. *Am J Physiol*, 1992. **263**(6 Pt 2): p. F991-5.
231. Yamaguchi, S., et al., *Adenosine A1 receptor mRNA in microdissected rat nephron segments*. *Hypertension*, 1995. **26**(6 Pt 2): p. 1181-5.
232. Takeda, M., K. Yoshitomi, and M. Imai, *Regulation of Na(+)-3HCO3- cotransport in rabbit proximal convoluted tubule via adenosine A1 receptor*. *Am J Physiol*, 1993. **265**(4 Pt 2): p. F511-9.
233. Wengert, M., et al., *Stimulation of the proximal tubule Na+-ATPase activity by adenosine A(2A) receptor*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005. **37**(1): p. 155-65.
234. Kang, H.S., et al., *Adenosine modulates Mg(2+) uptake in distal convoluted tubule cells via A(1) and A(2) purinoceptors*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2001. **281**(6): p. F1141-7.
235. Dai, Y., et al., *A2B adenosine receptor-mediated induction of IL-6 promotes CKD*. *J Am Soc Nephrol*, 2011. **22**(5): p. 890-901.
236. Grenz, A., et al., *Adora2b adenosine receptor signaling protects during acute kidney injury via inhibition of neutrophil-dependent TNF-alpha release*. *J Immunol*, 2012. **189**(9): p. 4566-73.
237. Li, L., et al., *Dendritic cells tolerized with adenosine A(2)AR agonist attenuate acute kidney injury*. *J Clin Invest*, 2012. **122**(11): p. 3931-42.
238. Headrick, J.P., et al., *Cardiovascular adenosine receptors: Expression, actions and interactions*. *Pharmacol Ther*, 2013.
239. Noji, T., et al., *Treatment with an adenosine uptake inhibitor attenuates glomerulonephritis in mice*. *Eur J Pharmacol*, 2002. **449**(3): p. 293-300.
240. Ferenbach, D.A. and J. Hughes, *Adenosine A(2A) agonists as therapy for glomerulonephritis*. *Kidney Int*, 2011. **80**(4): p. 329-31.
241. Elsherbiny, N.M., et al., *Reno-protective effect of NECA in diabetic nephropathy: implication of IL-18 and ICAM-1*. *Eur Cytokine Netw*, 2012. **23**(3): p. 78-86.
242. Gill, A., et al., *Protective effect of tonapofylline (BG9928), an adenosine A1 receptor antagonist, against cisplatin-induced acute kidney injury in rats*. *Am J Nephrol*, 2009. **30**(6): p. 521-6.
243. Zhao, Z., C. Francis, and K. Ravid, *Characterization of the mouse A3 adenosine receptor gene: exon/intron organization and promoter activity*. *Genomics*, 1999. **57**(1): p. 152-5.
244. Eckle, T., et al., *Identification of ectonucleotidases CD39 and CD73 in innate protection during acute lung injury*. *J Immunol*, 2007. **178**(12): p. 8127-37.
245. Cerqueira, M.D., *Advances in pharmacologic agents in imaging: new A2A receptor agonists*. *Curr Cardiol Rep*, 2006. **8**(2): p. 119-22.

246. Funakoshi, H., et al., *Regulated overexpression of the A1-adenosine receptor in mice results in adverse but reversible changes in cardiac morphology and function*. *Circulation*, 2006. **114**(21): p. 2240-50.
247. Ensor, C.R. and S.D. Russell, *Tonapofylline: a selective adenosine-1 receptor antagonist for the treatment of heart failure*. *Expert Opin Pharmacother*, 2010. **11**(14): p. 2405-15.
248. Zimmermann, H., *Purinergic signaling in neural development*. *Semin Cell Dev Biol*, 2011. **22**(2): p. 194-204.
249. Migita, H., et al., *Activation of adenosine A1 receptor-induced neural stem cell proliferation via MEK/ERK and Akt signaling pathways*. *J Neurosci Res*, 2008. **86**(13): p. 2820-8.
250. Stafford, M.R., P.F. Bartlett, and D.J. Adams, *Purinergic receptor activation inhibits mitogen-stimulated proliferation in primary neurospheres from the adult mouse subventricular zone*. *Mol Cell Neurosci*, 2007. **35**(4): p. 535-48.
251. Delic, J. and H. Zimmermann, *Nucleotides affect neurogenesis and dopaminergic differentiation of mouse fetal midbrain-derived neural precursor cells*. *Purinergic Signal*, 2010. **6**(4): p. 417-28.
252. Antonioli, L., et al., *Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine*. *Nat Rev Cancer*, 2013. **13**(12): p. 842-57.
253. Thevananther, S., A. Rivera, and S.A. Rivkees, *A1 adenosine receptor activation inhibits neurite process formation by Rho kinase-mediated pathways*. *Neuroreport*, 2001. **12**(14): p. 3057-63.
254. Hindley, S., M.A. Herman, and M.P. Rathbone, *Stimulation of reactive astrogliosis in vivo by extracellular adenosine diphosphate or an adenosine A2 receptor agonist*. *J Neurosci Res*, 1994. **38**(4): p. 399-406.
255. Rousse, I. and R. Robitaille, *Calcium signaling in Schwann cells at synaptic and extra-synaptic sites: active glial modulation of neuronal activity*. *Glia*, 2006. **54**(7): p. 691-9.
256. Stevens, B., et al., *Adenosine: an activity-dependent axonal signal regulating MAP kinase and proliferation in developing Schwann cells*. *Neuron Glia Biol*, 2004. **1**(1): p. 23-34.
257. Stevens, B., et al., *Adenosine: a neuron-glial transmitter promoting myelination in the CNS in response to action potentials*. *Neuron*, 2002. **36**(5): p. 855-68.
258. Othman, T., H. Yan, and S.A. Rivkees, *Oligodendrocytes express functional A1 adenosine receptors that stimulate cellular migration*. *Glia*, 2003. **44**(2): p. 166-72.
259. Mediero, A. and B.N. Cronstein, *Adenosine and bone metabolism*. *Trends Endocrinol Metab*, 2013. **24**(6): p. 290-300.
260. Hofer, M., et al., *Adenosine potentiates stimulatory effects on granulocyte-macrophage hematopoietic progenitor cells in vitro of IL-3 and SCF, but not those of G-CSF, GM-CSF and IL-11*. *Physiol Res*, 2006. **55**(5): p. 591-6.
261. Ethier, M.F., V. Chander, and J.G. Dobson, Jr., *Adenosine stimulates proliferation of human endothelial cells in culture*. *Am J Physiol*, 1993. **265**(1 Pt 2): p. H131-8.
262. Wesley, U.V., et al., *Airway epithelial cell migration and wound repair by ATP-mediated activation of dual oxidase 1*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(5): p. 3213-20.
263. Montesinos, M.C., et al., *Adenosine promotes wound healing and mediates angiogenesis in response to tissue injury via occupancy of A(2A) receptors*. *Am J Pathol*, 2002. **160**(6): p. 2009-18.
264. Wang, L., et al., *CD73 has distinct roles in nonhematopoietic and hematopoietic cells to promote tumor growth in mice*. *J Clin Invest*, 2011. **121**(6): p. 2371-82.
265. Wang, L., et al., *Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2008. **134**(3): p. 365-72.
266. Madi, L., et al., *The A3 adenosine receptor is highly expressed in tumor versus normal cells: potential target for tumor growth inhibition*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(13): p. 4472-9.
267. Li, S., S. Huang, and S.B. Peng, *Overexpression of G protein-coupled receptors in cancer cells: involvement in tumor progression*. *Int J Oncol*, 2005. **27**(5): p. 1329-39.
268. Kalhan, A., et al., *Adenosine A2A and A2B receptor expression in neuroendocrine tumours: potential targets for therapy*. *Purinergic Signal*, 2012. **8**(2): p. 265-74.
269. Stagg, J. and M.J. Smyth, *Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer*. *Oncogene*, 2010. **29**(39): p. 5346-58.

270. Burnstock, G. and F. Di Virgilio, *Purinergic signalling and cancer*. *Purinergic Signal*, 2013. **9**(4): p. 491-540.
271. Hasko, G. and P. Pacher, *Regulation of macrophage function by adenosine*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012. **32**(4): p. 865-9.
272. Novitskiy, S.V., et al., *Adenosine receptors in regulation of dendritic cell differentiation and function*. *Blood*, 2008. **112**(5): p. 1822-31.
273. Ostrand-Rosenberg, S. and P. Sinha, *Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer*. *J Immunol*, 2009. **182**(8): p. 4499-506.
274. Hoskin, D.W., T. Reynolds, and J. Blay, *Adenosine as a possible inhibitor of killer T-cell activation in the microenvironment of solid tumours*. *Int J Cancer*, 1994. **59**(6): p. 854-5.
275. Ernst, P.B., J.C. Garrison, and L.F. Thompson, *Much ado about adenosine: adenosine synthesis and function in regulatory T cell biology*. *J Immunol*, 2010. **185**(4): p. 1993-8.
276. Mandapathil, M., et al., *Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(10): p. 7176-86.
277. Williams, B.A., J. Blay, and D.W. Hoskin, *2-chloroadenosine stimulates granule exocytosis from mouse natural killer cells: evidence for signal transduction through a novel extracellular receptor*. *Exp Cell Res*, 1997. **233**(1): p. 187-97.
278. MacKenzie, W.M., D.W. Hoskin, and J. Blay, *Adenosine inhibits the adhesion of anti-CD3-activated killer lymphocytes to adenocarcinoma cells through an A3 receptor*. *Cancer Res*, 1994. **54**(13): p. 3521-6.
279. Raskovalova, T., et al., *Gs protein-coupled adenosine receptor signaling and lytic function of activated NK cells*. *J Immunol*, 2005. **175**(7): p. 4383-91.
280. Hasko, G. and B.N. Cronstein, *Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity*. *Trends Immunol*, 2004. **25**(1): p. 33-9.
281. Jackson, S.W., et al., *Disordered purinergic signaling inhibits pathological angiogenesis in cd39/Entpd1-null mice*. *Am J Pathol*, 2007. **171**(4): p. 1395-404.
282. Merighi, S., et al., *Caffeine inhibits adenosine-induced accumulation of hypoxia-inducible factor-1alpha, vascular endothelial growth factor, and interleukin-8 expression in hypoxic human colon cancer cells*. *Mol Pharmacol*, 2007. **72**(2): p. 395-406.
283. Merighi, S., et al., *A(2B) and A(3) adenosine receptors modulate vascular endothelial growth factor and interleukin-8 expression in human melanoma cells treated with etoposide and doxorubicin*. *Neoplasia*, 2009. **11**(10): p. 1064-73.
284. Merighi, S., et al., *A3 adenosine receptors modulate hypoxia-inducible factor-1alpha expression in human A375 melanoma cells*. *Neoplasia*, 2005. **7**(10): p. 894-903.
285. Mirza, A., et al., *RNA interference targeting of A1 receptor-overexpressing breast carcinoma cells leads to diminished rates of cell proliferation and induction of apoptosis*. *Cancer Biol Ther*, 2005. **4**(12): p. 1355-60.
286. Lin, Z., et al., *Adenosine A1 receptor, a target and regulator of estrogen receptoralpha action, mediates the proliferative effects of estradiol in breast cancer*. *Oncogene*, 2010. **29**(8): p. 1114-22.
287. Etique, N., et al., *Crosstalk between adenosine receptor (A2A isoform) and ERalpha mediates ethanol action in MCF-7 breast cancer cells*. *Oncol Rep*, 2009. **21**(4): p. 977-81.
288. Ma, D.F., et al., *Hypoxia-inducible adenosine A2B receptor modulates proliferation of colon carcinoma cells*. *Hum Pathol*, 2010. **41**(11): p. 1550-7.
289. Wei, Q., et al., *A2B adenosine receptor blockade inhibits growth of prostate cancer cells*. *Purinergic Signal*, 2013. **9**(2): p. 271-80.
290. Varani, K., et al., *The stimulation of A(3) adenosine receptors reduces bone-residing breast cancer in a rat preclinical model*. *Eur J Cancer*, 2013. **49**(2): p. 482-91.
291. Aghaei, M., et al., *Adenosine induces cell-cycle arrest and apoptosis in androgen-dependent and -independent prostate cancer cell lines, LNCap-FGC-10, DU-145, and PC3*. *Prostate*, 2012. **72**(4): p. 361-75.
292. Kamiya, H., et al., *Apoptosis-related gene transcription in human A549 lung cancer cells via A(3) adenosine receptor*. *Cell Physiol Biochem*, 2012. **29**(5-6): p. 687-96.
293. Wen, L.T. and A.F. Knowles, *Extracellular ATP and adenosine induce cell apoptosis of human hepatoma Li-7A cells via the A3 adenosine receptor*. *Br J Pharmacol*, 2003. **140**(6): p. 1009-18.

294. Hofer, M., et al., *Effects of adenosine on the growth of murine G:5:113 fibrosarcoma cells in vitro*. Folia Biol (Praha), 2003. **49**(5): p. 207-10.
295. Masse, K. and N. Dale, *Purines as potential morphogens during embryonic development*. Purinergic Signal, 2012. **8**(3): p. 503-21.
296. Rivkees, S.A., *The ontogeny of cardiac and neural A1 adenosine receptor expression in rats*. Brain Res Dev Brain Res, 1995. **89**(2): p. 202-13.
297. Magdaleno, S., et al., *BGEM: an in situ hybridization database of gene expression in the embryonic and adult mouse nervous system*. PLoS Biol, 2006. **4**(4): p. e86.
298. Durand, I.H. and R.D. Green, *Cloning of a chick A3 adenosine receptor: characterization of ligand binding and receptor-effector coupling of chick A1 and A3 adenosine receptors*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2001. **363**(1): p. 81-6.
299. Ghatpande, S.K., et al., *Hypoxia induces cardiac malformations via A1 adenosine receptor activation in chicken embryos*. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2008. **82**(3): p. 121-30.
300. Zhao, Z., et al., *Overexpression of A3 adenosine receptors in smooth, cardiac, and skeletal muscle is lethal to embryos*. Microvasc Res, 2002. **63**(1): p. 61-9.
301. Boehmler, W., et al., *Identification of zebrafish A2 adenosine receptors and expression in developing embryos*. Gene Expr Patterns, 2009. **9**(3): p. 144-51.
302. Diez-Roux, G., et al., *A high-resolution anatomical atlas of the transcriptome in the mouse embryo*. PLoS Biol, 2011. **9**(1): p. e1000582.
303. Hahnel, A.C., et al., *Two alkaline phosphatase genes are expressed during early development in the mouse embryo*. Development, 1990. **110**(2): p. 555-64.
304. Sharov, A.A., et al., *Transcriptome analysis of mouse stem cells and early embryos*. PLoS Biol, 2003. **1**(3): p. E74.
305. Jenuth, J.P., E.R. Mably, and F.F. Snyder, *Modelling of purine nucleoside metabolism during mouse embryonic development: relative routes of adenosine, deoxyadenosine, and deoxyguanosine metabolism*. Biochem Cell Biol, 1996. **74**(2): p. 219-25.
306. Chechik, B.E., et al., *Immunomorphological localization of adenosine deaminase in rat tissues during ontogeny*. Histochem J, 1985. **17**(2): p. 153-70.
307. Nureddin, A., E. Epsaro, and A.A. Kiessling, *Purines inhibit the development of mouse embryos in vitro*. J Reprod Fertil, 1990. **90**(2): p. 455-64.
308. Tsuchimori, N., et al., *Adenosine induces dormancy in starfish blastulae*. Development, 1988. **103**(2): p. 345-51.
309. Adair, T.H., et al., *Vascular development in chick embryos: a possible role for adenosine*. Am J Physiol, 1989. **256**(1 Pt 2): p. H240-6.
310. Iijima, R., et al., *The extracellular adenosine deaminase growth factor, ADGF/CECR1, plays a role in Xenopus embryogenesis via the adenosine/P1 receptor*. J Biol Chem, 2008. **283**(4): p. 2255-64.
311. Kalin, R.E., et al., *An in vivo chemical library screen in Xenopus tadpoles reveals novel pathways involved in angiogenesis and lymphangiogenesis*. Blood, 2009. **114**(5): p. 1110-22.
312. Knudsen, T.B. and W.A. Elmer, *Evidence for negative control of growth by adenosine in the mammalian embryo: induction of Hmx/+ mutant limb outgrowth by adenosine deaminase*. Differentiation, 1987. **33**(3): p. 270-9.
313. Choi, D.S., et al., *The type 1 equilibrative nucleoside transporter regulates ethanol intoxication and preference*. Nat Neurosci, 2004. **7**(8): p. 855-61.
314. Duan, H. and J. Wang, *Impaired monoamine and organic cation uptake in choroid plexus in mice with targeted disruption of the plasma membrane monoamine transporter (Slc29a4) gene*. J Biol Chem, 2013. **288**(5): p. 3535-44.
315. Blackburn, M.R., S.K. Datta, and R.E. Kellems, *Adenosine deaminase-deficient mice generated using a two-stage genetic engineering strategy exhibit a combined immunodeficiency*. J Biol Chem, 1998. **273**(9): p. 5093-100.
316. Boison, D., et al., *Neonatal hepatic steatosis by disruption of the adenosine kinase gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(10): p. 6985-90.
317. Schmitt, S.M., M. Gull, and A.W. Brandli, *Engineering Xenopus embryos for phenotypic drug discovery screening*. Adv Drug Deliv Rev, 2014. **69-70**: p. 225-46.



318. Hellsten, U., et al., *Accelerated gene evolution and subfunctionalization in the pseudotetraploid frog Xenopus laevis*. BMC Biol, 2007. **5**: p. 31.
319. Elkan, E.R., *The Xenopus Pregnancy Test*. Br Med J, 1938. **2**(4067): p. 1253-1274 2.
320. Roberts, N.A., et al., *Heparanase 2, mutated in urofacial syndrome, mediates peripheral neural development in Xenopus*. Hum Mol Genet, 2014. **23**(16): p. 4302-14.
321. Reversade, B., et al., *Mutations in PYCR1 cause cutis laxa with progeroid features*. Nat Genet, 2009. **41**(9): p. 1016-21.
322. Giannaccini, M., et al., *Non-mammalian vertebrate embryos as models in nanomedicine*. Nanomedicine, 2014. **10**(4): p. 703-19.
323. Pratt, K.G. and A.S. Khakhalin, *Modeling human neurodevelopmental disorders in the Xenopus tadpole: from mechanisms to therapeutic targets*. Dis Model Mech, 2013. **6**(5): p. 1057-65.
324. Bonnard, C., et al., *Mutations in IRX5 impair craniofacial development and germ cell migration via SDF1*. Nat Genet, 2012. **44**(6): p. 709-13.
325. Chain, F.J. and B.J. Evans, *Multiple mechanisms promote the retained expression of gene duplicates in the tetraploid frog Xenopus laevis*. PLoS Genet, 2006. **2**(4): p. e56.
326. Brown, P. and N. Dale, *Adenosine A1 receptors modulate high voltage-activated Ca<sup>2+</sup> currents and motor pattern generation in the xenopus embryo*. J Physiol, 2000. **525 Pt 3**: p. 655-67.
327. James-Zorn, C., et al., *Xenbase: expansion and updates of the Xenopus model organism database*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(Database issue): p. D865-70.
328. Sive, H.L., R.M. Grainger, and R.M. Harland, *Xenopus laevis In Vitro Fertilization and Natural Mating Methods*. CSH Protoc, 2007. **2007**: p. pdb prot4737.
329. Sive, H.L., R.M. Grainger, and R.M. Harland, *Inducing Ovulation in Xenopus laevis*. CSH Protoc, 2007. **2007**: p. pdb prot4734.
330. Nieuwkoop, P.D. and J. Faber, *Normal Table of Xenopus laevis (Daudin)*. Garland Publishing Inc., New York, 1994.
331. Dale, L. and J.M. Slack, *Fate map for the 32-cell stage of Xenopus laevis*. Development, 1987. **99**(4): p. 527-51.
332. Wells, D.E., et al., *A genetic map of Xenopus tropicalis*. Dev Biol, 2011. **354**(1): p. 1-8.
333. Khokha, M.K., et al., *Techniques and probes for the study of Xenopus tropicalis development*. Dev Dyn, 2002. **225**(4): p. 499-510.
334. Brown, D.D., *A tribute to the Xenopus laevis oocyte and egg*. J Biol Chem, 2004. **279**(44): p. 45291-9.
335. Gurdon, J.B., et al., *Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells*. Nature, 1971. **233**(5316): p. 177-82.
336. Miledi, R., *A calcium-dependent transient outward current in Xenopus laevis oocytes*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1982. **215**(1201): p. 491-7.
337. Gundersen, C.B., R. Miledi, and I. Parker, *Voltage-operated channels induced by foreign messenger RNA in Xenopus oocytes*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1983. **220**(1218): p. 131-40.
338. Papke, R.L. and C. Smith-Maxwell, *High throughput electrophysiology with Xenopus oocytes*. Comb Chem High Throughput Screen, 2009. **12**(1): p. 38-50.
339. Yakel, J.L., et al., *Functional expression of adenosine A2b receptor in Xenopus oocytes*. Mol Pharmacol, 1993. **43**(2): p. 277-80.
340. Okabayashi, K. and M. Asashima, *Tissue generation from amphibian animal caps*. Curr Opin Genet Dev, 2003. **13**(5): p. 502-7.
341. Sedohara, A., S. Komazaki, and M. Asashima, *In vitro induction and transplantation of eye during early Xenopus development*. Dev Growth Differ, 2003. **45**(5-6): p. 463-71.
342. Nusslein-Volhard, C. and E. Wieschaus, *Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila*. Nature, 1980. **287**(5785): p. 795-801.
343. Goda, T., et al., *Genetic screens for mutations affecting development of Xenopus tropicalis*. PLoS Genet, 2006. **2**(6): p. e91.
344. Kawakami, K., *Tol2: a versatile gene transfer vector in vertebrates*. Genome Biol, 2007. **8 Suppl 1**: p. S7.
345. Yergeau, D.A., et al., *Forward genetic screens in Xenopus using transposon-mediated insertional mutagenesis*. Methods Mol Biol, 2012. **917**: p. 111-27.

346. Wheeler, G.N. and A.W. Brandli, *Simple vertebrate models for chemical genetics and drug discovery screens: lessons from zebrafish and Xenopus*. Dev Dyn, 2009. **238**(6): p. 1287-308.
347. Dush, M.K., et al., *Heterotaxin: a TGF-beta signaling inhibitor identified in a multi-phenotype profiling screen in Xenopus embryos*. Chem Biol, 2011. **18**(2): p. 252-63.
348. Tomlinson, M.L., et al., *A chemical genomic approach identifies matrix metalloproteinases as playing an essential and specific role in Xenopus melanophore migration*. Chem Biol, 2009. **16**(1): p. 93-104.
349. Sive, H.L., R.M. Grainger, and R.M. Harland, *Microinjection of Xenopus embryos*. Cold Spring Harb Protoc, 2010. **2010**(12): p. pdb ip81.
350. Heasman, J., M. Kofron, and C. Wylie, *Beta-catenin signaling activity dissected in the early Xenopus embryo: a novel antisense approach*. Dev Biol, 2000. **222**(1): p. 124-34.
351. Heasman, J., *Morpholino oligos: making sense of antisense?* Dev Biol, 2002. **243**(2): p. 209-14.
352. Eisen, J.S. and J.C. Smith, *Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense*. Development, 2008. **135**(10): p. 1735-43.
353. Lund, E., et al., *Limiting Ago protein restricts RNAi and microRNA biogenesis during early development in Xenopus laevis*. Genes Dev, 2011. **25**(11): p. 1121-31.
354. Moody, S.A. and M.J. Kline, *Segregation of fate during cleavage of frog (Xenopus laevis) blastomeres*. Anat Embryol (Berl), 1990. **182**(4): p. 347-62.
355. Kroll, K.L. and E. Amaya, *Transgenic Xenopus embryos from sperm nuclear transplantations reveal FGF signaling requirements during gastrulation*. Development, 1996. **122**(10): p. 3173-83.
356. Chesneau, A., et al., *Transgenesis procedures in Xenopus*. Biol Cell, 2008. **100**(9): p. 503-21.
357. Loewen, C.J., et al., *The role of subunit assembly in peripherin-2 targeting to rod photoreceptor disk membranes and retinitis pigmentosa*. Mol Biol Cell, 2003. **14**(8): p. 3400-13.
358. Urnov, F.D., et al., *Genome editing with engineered zinc finger nucleases*. Nat Rev Genet, 2010. **11**(9): p. 636-46.
359. Kim, Y.G., J. Cha, and S. Chandrasegaran, *Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(3): p. 1156-60.
360. Romagnani, P., L. Lasagni, and G. Remuzzi, *Renal progenitors: an evolutionary conserved strategy for kidney regeneration*. Nat Rev Nephrol, 2013. **9**(3): p. 137-46.
361. Lei, Y., et al., *Efficient targeted gene disruption in Xenopus embryos using engineered transcription activator-like effector nucleases (TALENs)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(43): p. 17484-9.
362. Chen, S., et al., *A large-scale in vivo analysis reveals that TALENs are significantly more mutagenic than ZFNs generated using context-dependent assembly*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(4): p. 2769-78.
363. Suzuki, K.T., et al., *High efficiency TALENs enable F0 functional analysis by targeted gene disruption in Xenopus laevis embryos*. Biol Open, 2013. **2**(5): p. 448-52.
364. Sampson, T.R. and D.S. Weiss, *Exploiting CRISPR/Cas systems for biotechnology*. Bioessays, 2014. **36**(1): p. 34-8.
365. Nakayama, T., et al., *Simple and efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in Xenopus tropicalis*. Genesis, 2013. **51**(12): p. 835-43.
366. Guo, X., et al., *Efficient RNA/Cas9-mediated genome editing in Xenopus tropicalis*. Development, 2014. **141**(3): p. 707-14.
367. Heasman, J., *Patterning the early Xenopus embryo*. Development, 2006. **133**(7): p. 1205-17.
368. De Robertis, E.M. and H. Kuroda, *Dorsal-ventral patterning and neural induction in Xenopus embryos*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2004. **20**: p. 285-308.
369. Hill, C.S., *TGF-beta signalling pathways in early Xenopus development*. Curr Opin Genet Dev, 2001. **11**(5): p. 533-40.
370. Warkman, A.S. and P.A. Krieg, *Xenopus as a model system for vertebrate heart development*. Semin Cell Dev Biol, 2007. **18**(1): p. 46-53.
371. Pearl, E.J., et al., *Xenopus pancreas development*. Dev Dyn, 2009. **238**(6): p. 1271-86.
372. Blitz, I.L., G. Andelfinger, and M.E. Horb, *Germ layers to organs: using Xenopus to study "later" development*. Semin Cell Dev Biol, 2006. **17**(1): p. 133-45.

373. Jones, E.A., *Xenopus: a prince among models for pronephric kidney development*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(2): p. 313-21.
374. Wessely, O. and U. Tran, *Xenopus pronephros development--past, present, and future*. Pediatr Nephrol, 2011. **26**(9): p. 1545-51.
375. Chow, R.L. and R.A. Lang, *Early eye development in vertebrates*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2001. **17**: p. 255-96.
376. Zuber, M.E., *Eye field specification in Xenopus laevis*. Curr Top Dev Biol, 2010. **93**: p. 29-60.
377. Amato, M.A., E. Arnault, and M. Perron, *Retinal stem cells in vertebrates: parallels and divergences*. Int J Dev Biol, 2004. **48**(8-9): p. 993-1001.
378. McFarlane, S. and B. Lom, *The Xenopus retinal ganglion cell as a model neuron to study the establishment of neuronal connectivity*. Dev Neurobiol, 2012. **72**(4): p. 520-36.
379. Raciti, D., et al., *Organization of the pronephric kidney revealed by large-scale gene expression mapping*. Genome Biol, 2008. **9**(5): p. R84.
380. Vize, P.D., et al., *Model systems for the study of kidney development: use of the pronephros in the analysis of organ induction and patterning*. Dev Biol, 1997. **188**(2): p. 189-204.
381. Parain, K., et al., *A large scale screen for neural stem cell markers in Xenopus retina*. Dev Neurobiol, 2012. **72**(4): p. 491-506.
382. Carroll, T.J. and P.D. Vize, *Wilms' tumor suppressor gene is involved in the development of disparate kidney forms: evidence from expression in the Xenopus pronephros*. Dev Dyn, 1996. **206**(2): p. 131-8.
383. Street, S.E., et al., *Tissue-nonspecific alkaline phosphatase acts redundantly with PAP and NT5E to generate adenosine in the dorsal spinal cord*. J Neurosci, 2013. **33**(27): p. 11314-22.
384. Tran, U., et al., *The RNA-binding protein bicaudal C regulates polycystin 2 in the kidney by antagonizing miR-17 activity*. Development, 2010. **137**(7): p. 1107-16.
385. Chan, T.C., T. Ariizumi, and M. Asashima, *A model system for organ engineering: transplantation of in vitro induced embryonic kidney*. Naturwissenschaften, 1999. **86**(5): p. 224-7.
386. Hollyfield, J.G., *Differential growth of the neural retina in Xenopus laevis larvae*. Dev Biol, 1971. **24**(2): p. 264-86.
387. Harris, W.A. and M. Perron, *Molecular recapitulation: the growth of the vertebrate retina*. Int J Dev Biol, 1998. **42**(3): p. 299-304.
388. Tropepe, V., et al., *Retinal stem cells in the adult mammalian eye*. Science, 2000. **287**(5460): p. 2032-6.
389. Ahmad, I., L. Tang, and H. Pham, *Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **270**(2): p. 517-21.
390. Kolk, S.M., et al., *Multiple control and dynamic response of the Xenopus melanotrope cell*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2002. **132**(1): p. 257-68.
391. Viczian, A.S. and M.E. Zuber, *A simple behavioral assay for testing visual function in Xenopus laevis*. J Vis Exp, 2014(88).
392. Blackiston, D., et al., *A second-generation device for automated training and quantitative behavior analyses of molecularly-tractable model organisms*. PLoS One, 2010. **5**(12): p. e14370.
393. Moore, K.B., M.L. Schneider, and M.L. Vetter, *Posttranslational mechanisms control the timing of bHLH function and regulate retinal cell fate*. Neuron, 2002. **34**(2): p. 183-95.
394. Ohnuma, S., et al., *Lipofection strategy for the study of Xenopus retinal development*. Methods, 2002. **28**(4): p. 411-9.
395. Falk, J., et al., *Electroporation of cDNA/Morpholinos to targeted areas of embryonic CNS in Xenopus*. BMC Dev Biol, 2007. **7**: p. 107.
396. Hirsch, N. and W.A. Harris, *Xenopus Pax-6 and retinal development*. J Neurobiol, 1997. **32**(1): p. 45-61.
397. Bailey, T.J., et al., *Regulation of vertebrate eye development by Rx genes*. Int J Dev Biol, 2004. **48**(8-9): p. 761-70.
398. Altmann, C.R., et al., *Lens induction by Pax-6 in Xenopus laevis*. Dev Biol, 1997. **185**(1): p. 119-23.

399. Zygar, C.A., T.L. Cook, and R.M. Grainger, Jr., *Gene activation during early stages of lens induction in Xenopus*. Development, 1998. **125**(17): p. 3509-19.
400. Casarosa, S., et al., *Xrx1, a novel Xenopus homeobox gene expressed during eye and pineal gland development*. Mech Dev, 1997. **61**(1-2): p. 187-98.
401. Mathers, P.H., et al., *The Rx homeobox gene is essential for vertebrate eye development*. Nature, 1997. **387**(6633): p. 603-7.
402. Viczian, A.S., et al., *Generation of functional eyes from pluripotent cells*. PLoS Biol, 2009. **7**(8): p. e1000174.
403. Masse, K., et al., *Purine-mediated signalling triggers eye development*. Nature, 2007. **449**(7165): p. 1058-62.
404. Hoppler, S., *Studying Wnt signaling in Xenopus*. Methods Mol Biol, 2008. **469**: p. 319-32.
405. Amaya, E., *Xenomics*. Genome Res, 2005. **15**(12): p. 1683-91.
406. Masse, K., et al., *Comparative genomic and expression analysis of the conserved NTPDase gene family in Xenopus*. Genomics, 2006. **87**(3): p. 366-81.
407. Mochizuki, T., et al., *Xenopus NM23-X4 regulates retinal gliogenesis through interaction with p27Xic1*. Neural Dev, 2009. **4**: p. 1.
408. Masse, K., et al., *Ectophosphodiesterase/nucleotide phosphohydrolase (Enpp) nucleotidases: cloning, conservation and developmental restriction*. Int J Dev Biol, 2010. **54**(1): p. 181-93.
409. Ouatas, T., et al., *Differential expression of nucleoside diphosphate kinases (NDPK/NM23) during Xenopus early development*. Int J Dev Biol, 1998. **42**(1): p. 43-52.
410. Gilchrist, M.J., et al., *Database of queryable gene expression patterns for Xenopus*. Dev Dyn, 2009. **238**(6): p. 1379-88.
411. Cheng, A.W., et al., *cDNA encodes Xenopus P2Y(1) nucleotide receptor: expression at the neuromuscular junctions*. Neuroreport, 2003. **14**(3): p. 351-7.
412. Bogdanov, Y.D., et al., *Early expression of a novel nucleotide receptor in the neural plate of Xenopus embryos*. J Biol Chem, 1997. **272**(19): p. 12583-90.
413. Yanai, I., et al., *Mapping gene expression in two Xenopus species: evolutionary constraints and developmental flexibility*. Dev Cell, 2011. **20**(4): p. 483-96.
414. Devader, C., et al., *A novel nucleotide receptor in Xenopus activates the cAMP second messenger pathway*. FEBS Lett, 2007. **581**(27): p. 5332-6.
415. Bourdelas, A., et al., *Dynamic expression pattern of distinct genes in the presomitic and somitic mesoderm during Xenopus development*. Int J Dev Biol, 2009. **53**(7): p. 1075-9.
416. Zuber, M.E., et al., *Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors*. Development, 2003. **130**(21): p. 5155-67.
417. Gerhart, J., et al., *Cortical rotation of the Xenopus egg: consequences for the anteroposterior pattern of embryonic dorsal development*. Development, 1989. **107 Suppl**: p. 37-51.
418. Tocco, A., et al., *Comparative genomic and expression analysis of the adenosine signaling pathway members in Xenopus*. Purinergic Signal, 2014.
419. Thompson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson, *CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice*. Nucleic Acids Res, 1994. **22**(22): p. 4673-80.
420. Inui, M., et al., *Xapelin and Xmsr are required for cardiovascular development in Xenopus laevis*. Dev Biol, 2006. **298**(1): p. 188-200.
421. Dale, N., et al., *Listening to the brain: microelectrode biosensors for neurochemicals*. Trends Biotechnol, 2005. **23**(8): p. 420-8.
422. Dale, N. and B.G. Frenguelli, *Measurement of purine release with microelectrode biosensors*. Purinergic Signal, 2012. **8**(Suppl 1): p. 27-40.
423. Narisawa, S., N. Frohlander, and J.L. Millan, *Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia*. Dev Dyn, 1997. **208**(3): p. 432-46.
424. Gammill, L.S. and H. Sive, *Identification of otx2 target genes and restrictions in ectodermal competence during Xenopus cement gland formation*. Development, 1997. **124**(2): p. 471-81.
425. Chow, R.L., et al., *Pax6 induces ectopic eyes in a vertebrate*. Development, 1999. **126**(19): p. 4213-22.

426. Andreazzoli, M., et al., *Role of Xrx1 in Xenopus eye and anterior brain development*. Development, 1999. **126**(11): p. 2451-60.
427. Oliver, G., et al., *Ectopic lens induction in fish in response to the murine homeobox gene Six3*. Mech Dev, 1996. **60**(2): p. 233-9.
428. Zuber, M.E., et al., *Giant eyes in Xenopus laevis by overexpression of XOptx2*. Cell, 1999. **98**(3): p. 341-52.
429. Wawersik, S., P. Purcell, and R.L. Maas, *Pax6 and the genetic control of early eye development*. Results Probl Cell Differ, 2000. **31**: p. 15-36.
430. Li, X., et al., *Tissue-specific regulation of retinal and pituitary precursor cell proliferation*. Science, 2002. **297**(5584): p. 1180-3.
431. Hill, R.E., et al., *Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene*. Nature, 1991. **354**(6354): p. 522-5.
432. Lagutin, O.V., et al., *Six3 repression of Wnt signaling in the anterior neuroectoderm is essential for vertebrate forebrain development*. Genes Dev, 2003. **17**(3): p. 368-79.
433. Porter, F.D., et al., *Lhx2, a LIM homeobox gene, is required for eye, forebrain, and definitive erythrocyte development*. Development, 1997. **124**(15): p. 2935-44.
434. Li, H., et al., *A single morphogenetic field gives rise to two retina primordia under the influence of the prechordal plate*. Development, 1997. **124**(3): p. 603-15.
435. Ogino, H., et al., *Transcription factors involved in lens development from the preplacodal ectoderm*. Dev Biol, 2012. **363**(2): p. 333-47.
436. Grainger, R.M., *Embryonic lens induction: shedding light on vertebrate tissue determination*. Trends Genet, 1992. **8**(10): p. 349-55.
437. Perron, M., et al., *The genetic sequence of retinal development in the ciliary margin of the Xenopus eye*. Dev Biol, 1998. **199**(2): p. 185-200.
438. Locker, M., et al., *A decade of mammalian retinal stem cell research*. Arch Ital Biol, 2010. **148**(2): p. 59-72.
439. Locker, M., et al., *Hedgehog signaling and the retina: insights into the mechanisms controlling the proliferative properties of neural precursors*. Genes Dev, 2006. **20**(21): p. 3036-48.
440. Denayer, T., H.T. Tran, and K. Vleminckx, *Transgenic reporter tools tracing endogenous canonical Wnt signaling in Xenopus*. Methods Mol Biol, 2008. **469**: p. 381-400.
441. Borday, C., et al., *Antagonistic cross-regulation between Wnt and Hedgehog signalling pathways controls post-embryonic retinal proliferation*. Development, 2012. **139**(19): p. 3499-509.
442. Chan, T. and M. Asashima, *Growing kidney in the frog*. Nephron Exp Nephrol, 2006. **103**(3): p. e81-5.
443. Carroll, T.J. and P.D. Vize, *Synergism between Pax-8 and lim-1 in embryonic kidney development*. Dev Biol, 1999. **214**(1): p. 46-59.
444. Brennan, H.C., S. Nijjar, and E.A. Jones, *The specification of the pronephric tubules and duct in Xenopus laevis*. Mech Dev, 1998. **75**(1-2): p. 127-37.
445. Maden, M., *Heads or tails? Retinoic acid will decide*. Bioessays, 1999. **21**(10): p. 809-12.
446. Cartry, J., et al., *Retinoic acid signalling is required for specification of pronephric cell fate*. Dev Biol, 2006. **299**(1): p. 35-51.
447. Colas, A., et al., *Mix.1/2-dependent control of FGF availability during gastrulation is essential for pronephros development in Xenopus*. Dev Biol, 2008. **320**(2): p. 351-65.
448. Le Bouffant, R., et al., *Retinoic acid-dependent control of MAP kinase phosphatase-3 is necessary for early kidney development in Xenopus*. Biol Cell, 2012. **104**(9): p. 516-32.
449. Seufert, D.W., et al., *Developmental basis of pronephric defects in Xenopus body plan phenotypes*. Dev Biol, 1999. **215**(2): p. 233-42.
450. Mitchell, T., et al., *Chordin affects pronephros development in Xenopus embryos by anteriorizing presomitic mesoderm*. Dev Dyn, 2007. **236**(1): p. 251-61.
451. Tetelin, S. and E.A. Jones, *Xenopus Wnt11b is identified as a potential pronephric inducer*. Dev Dyn, 2010. **239**(1): p. 148-59.
452. Wallingford, J.B., T.J. Carroll, and P.D. Vize, *Precocious expression of the Wilms' tumor gene xWT1 inhibits embryonic kidney development in Xenopus laevis*. Dev Biol, 1998. **202**(1): p. 103-12.

453. Carroll, T.J., J.B. Wallingford, and P.D. Vize, *Dynamic patterns of gene expression in the developing pronephros of Xenopus laevis*. Dev Genet, 1999. **24**(3-4): p. 199-207.
454. Urban, A.E., et al., *FGF is essential for both condensation and mesenchymal-epithelial transition stages of pronephric kidney tubule development*. Dev Biol, 2006. **297**(1): p. 103-17.
455. Bracken, C.M., K. Mizeracka, and K.A. McLaughlin, *Patterning the embryonic kidney: BMP signaling mediates the differentiation of the pronephric tubules and duct in Xenopus laevis*. Dev Dyn, 2008. **237**(1): p. 132-44.
456. McLaughlin, K.A., M.S. Rones, and M. Mercola, *Notch regulates cell fate in the developing pronephros*. Dev Biol, 2000. **227**(2): p. 567-80.
457. Naylor, R.W. and E.A. Jones, *Notch activates Wnt-4 signalling to control medio-lateral patterning of the pronephros*. Development, 2009. **136**(21): p. 3585-95.
458. Hsu, D.R., et al., *The Xenopus dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities*. Mol Cell, 1998. **1**(5): p. 673-83.
459. Saulnier, D.M., H. Ghanbari, and A.W. Brandli, *Essential function of Wnt-4 for tubulogenesis in the Xenopus pronephric kidney*. Dev Biol, 2002. **248**(1): p. 13-28.
460. Satow, R., T.C. Chan, and M. Asashima, *The role of Xenopus frizzled-8 in pronephric development*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **321**(2): p. 487-94.
461. Cleaver, O. and P.A. Krieg, *VEGF mediates angioblast migration during development of the dorsal aorta in Xenopus*. Development, 1998. **125**(19): p. 3905-14.
462. Coleman, J.E., *Structure and mechanism of alkaline phosphatase*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 1992. **21**: p. 441-83.
463. Sultana, S., et al., *An asparagine at position 417 of tissue-nonspecific alkaline phosphatase is essential for its structure and function as revealed by analysis of the N417S mutation associated with severe hypophosphatasia*. Mol Genet Metab, 2013. **109**(3): p. 282-8.
464. Narisawa, S., et al., *A novel phosphatase upregulated in Akp3 knockout mice*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **293**(5): p. G1068-77.
465. Whyte, M.P., *Physiological role of alkaline phosphatase explored in hypophosphatasia*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1192**: p. 190-200.
466. MacGregor, G.R., B.P. Zambrowicz, and P. Soriano, *Tissue non-specific alkaline phosphatase is expressed in both embryonic and extraembryonic lineages during mouse embryogenesis but is not required for migration of primordial germ cells*. Development, 1995. **121**(5): p. 1487-96.
467. Hough, T.A., et al., *Novel mouse model of autosomal semidominant adult hypophosphatasia has a splice site mutation in the tissue nonspecific alkaline phosphatase gene Akp2*. J Bone Miner Res, 2007. **22**(9): p. 1397-407.
468. Fedde, K.N., et al., *Alkaline phosphatase knock-out mice recapitulate the metabolic and skeletal defects of infantile hypophosphatasia*. J Bone Miner Res, 1999. **14**(12): p. 2015-26.
469. Ohkubo, S., J. Kimura, and I. Matsuoka, *Ecto-alkaline phosphatase in NG108-15 cells : a key enzyme mediating P1 antagonist-sensitive ATP response*. Br J Pharmacol, 2000. **131**(8): p. 1667-72.
470. Diez-Zaera, M., et al., *Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes axonal growth of hippocampal neurons*. Mol Biol Cell, 2011. **22**(7): p. 1014-24.
471. Narisawa, S., et al., *Stage-specific expression of alkaline phosphatase during neural development in the mouse*. Dev Dyn, 1994. **201**(3): p. 227-35.
472. Breathnach, R. and P. Chambon, *Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins*. Annu Rev Biochem, 1981. **50**: p. 349-83.
473. Haldin, C.E., et al., *The lmx1b gene is pivotal in glomus development in Xenopus laevis*. Dev Biol, 2008. **322**(1): p. 74-85.
474. Kintner, C.R. and J.P. Brockes, *Monoclonal antibodies to the cells of a regenerating limb*. J Embryol Exp Morphol, 1985. **89**: p. 37-55.
475. Sive, H.L., R.M. Grainger, and R.M. Harland, *Synthesis and purification of digoxigenin-labeled RNA probes for in situ hybridization*. CSH Protoc, 2007. **2007**: p. pdb prot4778.
476. Pommereit, D., T. Pieler, and T. Hollemann, *Xpitx3: a member of the Rieg/Pitx gene family expressed during pituitary and lens formation in Xenopus laevis*. Mech Dev, 2001. **102**(1-2): p. 255-7.

477. Seville, R.A., et al., *Annexin IV (Xanx-4) has a functional role in the formation of pronephric tubules*. Development, 2002. **129**(7): p. 1693-704.
478. Silvent, J., et al., *Molecular Evolution of the Tissue-nonspecific Alkaline Phosphatase Allows Prediction and Validation of Missense Mutations Responsible for Hypophosphatasia*. J Biol Chem, 2014. **289**(35): p. 24168-79.
479. Eid, S.R. and A.W. Brandli, *Xenopus Na,K-ATPase: primary sequence of the beta2 subunit and in situ localization of alpha1, beta1, and gamma expression during pronephric kidney development*. Differentiation, 2001. **68**(2-3): p. 115-25.
480. Ermonval, M., et al., *The cellular prion protein interacts with the tissue non-specific alkaline phosphatase in membrane microdomains of bioaminergic neuronal cells*. PLoS One, 2009. **4**(8): p. e6497.
481. Yang, Y., et al., *Dynamic Evolution of the LPS-Detoxifying Enzyme Intestinal Alkaline Phosphatase in Zebrafish and Other Vertebrates*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 314.
482. Alvarez-Hernan, G., et al., *Islet-1 immunoreactivity in the developing retina of Xenopus laevis*. ScientificWorldJournal, 2013. **2013**: p. 740420.
483. McGowan, S.L., et al., *Stem cell markers in the human posterior limbus and corneal endothelium of unwounded and wounded corneas*. Mol Vis, 2007. **13**: p. 1984-2000.
484. Alarcon, P., et al., *A dual requirement for Iroquois genes during Xenopus kidney development*. Development, 2008. **135**(19): p. 3197-207.
485. Romaker, D., B. Zhang, and O. Wessely, *An immunofluorescence method to analyze the proliferation status of individual nephron segments in the Xenopus pronephric kidney*. Methods Mol Biol, 2012. **886**: p. 121-32.
486. Hui, M., M. Hu, and H.C. Tenenbaum, *Changes in cell adhesion and cell proliferation are associated with expression of tissue non-specific alkaline phosphatase*. Cell Tissue Res, 1993. **274**(3): p. 429-37.
487. Thibaudau, G., et al., *Three populations of migrating amphibian embryonic cells utilize different guidance cues*. Dev Biol, 1993. **159**(2): p. 657-68.
488. Krishna, A.P. and T. Ramakrishna, *Effect of pyridoxine deficiency on the exploratory behavior of rats*. Int J Psychophysiol, 1984. **2**(1): p. 39-43.
489. Burnstock, G., L.C. Evans, and M.A. Bailey, *Purinergic signalling in the kidney in health and disease*. Purinergic Signal, 2014. **10**(1): p. 71-101.
490. de Carvalho, R.P., et al., *Developmental regulation of adenosine A1 receptors, uptake sites and endogenous adenosine in the chick retina*. Brain Res Dev Brain Res, 1992. **70**(1): p. 87-95.
491. de Mello, M.C., et al., *Regulation of dopamine- and adenosine-dependent adenylate cyclase systems of chicken embryo retina cells in culture*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(18): p. 5708-12.
492. Sugioka, M., Y. Fukuda, and M. Yamashita, *Ca<sup>2+</sup> responses to ATP via purinoceptors in the early embryonic chick retina*. J Physiol, 1996. **493 ( Pt 3)**: p. 855-63.
493. Yamashita, M. and M. Sugioka, *Calcium Mobilization Systems During Neurogenesis*. News Physiol Sci, 1998. **13**: p. 75-79.
494. Sugioka, M., et al., *Involvement of P2 purinoceptors in the regulation of DNA synthesis in the neural retina of chick embryo*. Int J Dev Neurosci, 1999. **17**(2): p. 135-44.
495. Sanches, G., L.S. de Alencar, and A.L. Ventura, *ATP induces proliferation of retinal cells in culture via activation of PKC and extracellular signal-regulated kinase cascade*. Int J Dev Neurosci, 2002. **20**(1): p. 21-7.
496. Pearson, R.A., et al., *ATP released via gap junction hemichannels from the pigment epithelium regulates neural retinal progenitor proliferation*. Neuron, 2005. **46**(5): p. 731-44.
497. Ng, A., et al., *Zebrafish mutations in gart and paics identify crucial roles for de novo purine synthesis in vertebrate pigmentation and ocular development*. Development, 2009. **136**(15): p. 2601-11.
498. Tiong, S.Y., et al., *Drosophila purine auxotrophy: new alleles of adenosine 2 exhibiting a complex visible phenotype*. Biochem Genet, 1989. **27**(5-6): p. 333-48.
499. Burnstock, G. and H. Ulrich, *Purinergic signaling in embryonic and stem cell development*. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(8): p. 1369-94.







# ANNEXES

## Annexe I : « *Curriculum vitae* scientifique »

### Communications scientifiques

- **Publications**

- **Comparative genomic and expression analysis of the adenosine signalling pathway members in *Xenopus*.** Alice Tocco, Benoit Pinson, Pierre Thiébaud, Nadine Thézé, Karine Massé. (soumis à « Purinergic signalling » - article partie 1)
- **The enpp4 ectonucleotidase regulates kidney patterning signalling networks in *Xenopus* embryos.** Karine Massé, Junichi Kyuno, Surinder Bhamra, Alice Tocco, Christian Paroissin, Lilly Maneta-Peyret, Elizabeth A. Jones. (en révision dans “Plos Biology” – Annexe II)
- **Stimulation of the human RAD51 nucleofilament restricts HIV-1 integration *in vitro* and in infected cells (2012).** Cosnefroy O, Tocco A, Lesbats P, Thierry S, Calmels C, Wiktorowicz T, Reigadas S, Kwon Y, De Cian A, Desfarges S, Bonot P, San Filippo J, Litvak S, Cam EL, Rethwilm A, Fleury H, Connell PP, Sung P, Delelis O, Andréola ML, Parissi V. Journal of Virology, 86:513-26 (stage de Master M2)

- **Communications orales et écrites lors de congrès internationaux**

- **Communication orale**

- *Characterization of adenosine purinergic pathway actors in *Xenopus laevis** - « Congrès cellules souches » à Bordeaux - 20 au 22 mars 2013

- **Communications écrites**

- *Characterization of purinergic signalling pathway in *Xenopus** - «14th International *Xenopus* Conference» à la presqu’île de Gien - 9 au 13 septembre 2012

### Participation à des journées scientifiques

- **Communication orale**

- *Rôle de l’adénosine au cours de l’embryogenèse, étude de la phosphatase alcaline alpl* - « Journée de l’école doctorale » à Arcachon - 9 avril 2014

- **Communications écrites**

- *Rôles de l’adénosine dans l’embryogénèse: Etude de l’enzyme ALPL chez le xénope* - «Journée de l’école doctorale» à Arcachon - 10 avril 2013
- *Characterization of purinergic signalling pathway in *Xenopus** - «Journée de la SFR Transbiomed» à Bordeaux - 4 décembre 2012



## Participation à des séminaires

- **UMR-CNRS 5164**

- *Projet de thèse* - 3<sup>ème</sup> année - 6 mars 2014
- Journal club « *Stratégie TALEN* » - 6 décembre 2012
- Journal club « *CD73 et VIH* » - 10 mai 2012
- *Projet de thèse - projet* - 17 novembre 2011

- **Club cellule souche**

- *Highlight du congrès « 14th international Xenopus Conference »* - 14 novembre 2012

## Formations scientifiques et professionnalisantes

- **Monitorat**

- Participation à l'encadrement des étudiants ainsi qu'à la préparation des TP « développement animal » de l'UE BCDA (Biologie Cellulaire et Développement Animal) et TP de l'EU SC (Signalisation Cellulaire) au cours de mes 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> années de thèse (**128 heures**)

- **Encadrement de stagiaires**

- Participation à l'encadrement de M<sup>elle</sup> Camille Cosse (stagiaire volontaire de L3) en juin 2012 Sujet du projet de stage : *Caractérisation des enzymes alpl et acpp chez X.laevis* (**4 semaines**)

- **Formations**

- Formation des doctorants contractuels parcours enseignement au cours de mes 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> années de thèse (**78 heures**)
- Formation aux biosenseurs adénosine et ATP par le Pr. N. Dale en décembre 2012- Université de Warwick, Angleterre (**8 jours**)
- Module d'anglais "*from text to talk*" - 13 et 14 juin 2012 (**6 heures**)

- **Association**

- Membre actif de l'association des doctorants *TBM doc's* - Organisation de 3 journées et 6 soirées de rencontres scientifiques pour les étudiants - Depuis novembre 2011
- Membre actif de l'association *Pint of Science* – Organisation de 3 soirées de rencontre chercheur/public dans le cadre d'un pub – Mai 2014



## Annexe II : article de recherche

### **The enpp4 ectonucleotidase regulates kidney patterning signalling networks in *Xenopus* embryos.**

Karine Massé, Junichi Kyuno, Surinder Bhamra, **Alice Tocco**, Christian Paroissin, Lilly Maneta-Peyret, Elizabeth A. Jones

Les ectophosphodiesterase/nucleotide phosphohydrolases (enpp) appartiennent à la famille des ectonucléotidases qui contrôle la voie de signalisation purinergique en contrôlant la concentration extracellulaire en ATP, ADP et également en adénosine. Ces enzymes sont également impliquées dans la voie de signalisation lipidique en générant les lipides bioactifs LPA et S1P. Cependant, alors que les fonctions et caractéristiques enzymatiques des protéines enpp1, 2, 3, 6 et 7 sont bien décrites, rien n'est connu concernant l'enzyme enpp4. L'article auquel j'ai participé démontre l'importance de cette protéine dans la formation du rein *via* la voie de signalisation lipidique. Enpp4 interviendrait dans la régulation du développement rénal par l'intermédiaire du récepteur s1pr5, conservé sous forme d'homéologues chez le xénope (a et b), à travers un mécanisme non-catalytique.

J'ai été impliquée dans ce travail lors de la révision de ce papier en début d'année 2014. Mon rôle a été de comparer les profils d'expression des gènes *s1pr5.a* et *.b* par RT-PCR, chez l'adulte et au cours du développement embryonnaire et de vérifier la spécificité des deux MO initialement désignés sur la séquence du gène *s1pr5a* (Fig.S6). J'ai été également impliquée dans les analyses statistiques (Table S1B, S1C, S2B, S3B et S4B).



# **The enpp4 ectonucleotidase regulates kidney patterning signalling networks in *Xenopus* embryos.**

Karine Massé<sup>1, 2, 3, #, \*</sup>, Junichi Kyuno<sup>1, #</sup>, Surinder Bhamra<sup>1</sup>, **Alice Tocco**<sup>2, 3</sup>, Christian Paroissin<sup>4</sup>, Lilly Maneta-Peyret<sup>5, 6</sup> and Elizabeth A. Jones<sup>1</sup>

<sup>1</sup> School of Life Sciences, Warwick University, Coventry, CV47AL, U.K.

<sup>2</sup> Université de Bordeaux, CIRID, UMR 5164, F-33000 Bordeaux Cedex, France

<sup>3</sup> CNRS, CIRID, UMR 5164, F-33000 Bordeaux Cedex, France

<sup>4</sup> Université de Pau et des Pays de l'Adour, Laboratoire de Mathématiques et de leurs Applications - UMR CNRS 5142, 64013 Pau cedex, France

<sup>5</sup> Université de Bordeaux, UMR 5200, 33883 Villenave d'Ornon Cedex, France

<sup>6</sup> CNRS, UMR 5200, 33883 Villenave d'Ornon Cedex, France

[karine.masse@u-bordeaux.fr](mailto:karine.masse@u-bordeaux.fr)

Tel: +33 (0)5 57 57 92 66

Fax: +33 (0) 57 57 14 72

# These authors contributed equally to this work.



## Short title

Enpp4 is involved in pronephros formation and patterning

## Abstract

Enpps are ectonucleotidases, which regulate lipidic and purinergic signalling pathways by controlling the extracellular concentrations of purines and bioactive lipids such as lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate. Both pathways are key regulators of kidney physiology and their deregulation has been linked to human renal pathologies. However, their potential roles during renal development have not been fully established. We previously showed that the *Xenopus* embryonic kidney, the pronephros, was a major site of expression for the enpp enzymes. We now demonstrate an unsuspected role for lipidic signalling and for the conserved but unstudied enpp4 protein in regulating kidney formation in *Xenopus*. Over-expression of enpp4, which is specifically expressed in the frog embryonic kidney, results in ectopic renal tissues, mostly composed of proximal tubules segments, and, on rare occasion, complete mini-duplication of the entire kidney. Enpp4 might act upstream of the RA, Notch and Wnt pathways, major regulators of kidney development, as its over-expression leads to ectopic expression of members of these pathways. Enpp4 is required for kidney development as its knock-down reduces expression of early kidney markers. Enpp4 is a membrane protein which binds, without hydrolyzing, the lipid phosphatidylserine. Finally, the effects of enpp4 are mediated by the lipidic receptor s1pr5, although not *via* the generation of S1P. Our results are the first to demonstrate a physiological role for the conserved vertebrate enpp4 protein and we propose a novel and surprising mechanism by which lipidic signalling regulates kidney development, *via* a non-catalytic mechanism.

## Key Words

Enpp4, ectonucleotidase, s1p5r, lipidic signalling, pronephros, *Xenopus*.

## Abbreviations list

Enpp: ectophosphodiesterase/nucleotide phosphohydrolases; LPA: lysophosphatidic acid; MO: morpholino-oligonucleotide; PA: phosphatidic acid; PLA, phospholipase A; PLC, phospholipase C; PLD, phospholipase D; PS: phosphatidylserine; RA: retinoic acid; S1P: sphingosine-1-phosphate

## Introduction

Vertebrate kidney organogenesis is orchestrated by numerous transcription factors and growth factors regulating the proliferation and differentiation of diverse cell types to form the functional kidney. Despite the differences in complexity and organization of the three vertebrate kidneys, pronephros, mesonephros and metanephros, there is a remarkable conservation of molecular mechanisms in the organogenesis of these three kinds of kidney (reviewed in 1-3). The pronephros, the functional embryonic kidney in amphibians, is a simple, easily accessible organ, which displays structural similarities to the other more complex kidney forms (4, 5). Therefore, it has become an ideal model system to study molecular regulation during nephrogenesis and renal pathologies (4, 6-10).

We have cloned all the members of the *enpp* family in *Xenopus laevis* and demonstrated that the pronephros is the major site of expression for these genes (11). The *enpp* proteins belong to the ectonucleotidase subfamily (12, 13). While *enpp*1, 2 and 3 catalytically interact with a wide range of extracellular nucleotides (purines and pyrimidines) and their derivatives, *enpp*2, 6, 7 can generate bioactive lipids, especially S1P and LPA. Sequence and structural homologies suggest that *enpp*4 and 5 may be more similar to the *enpp*6 and 7 sub-group (11, 13, 14). However, a recent study demonstrated that ENPP4 can generate ADP and ATP from diadenosine polyphosphates (15). These dual enzymatic activities place the *enpp* proteins as key regulators of both the purinergic and lipidic signalling pathways (16, 17).

Purines, mostly ATP and its derivatives, and bioactive lipids S1P and LPA can function as extracellular ligands for G-coupled cell surface receptors (18, 19). The activation of these receptors induce classic G protein coupled signalling pathways, producing diverse downstream cellular responses including cell proliferation, cell growth, cell survival, cell migration and morphogenesis. Due to the heterogeneity of the receptor types, the broad distribution of these receptors and their wide effector pathways, purines and bioactive lipids

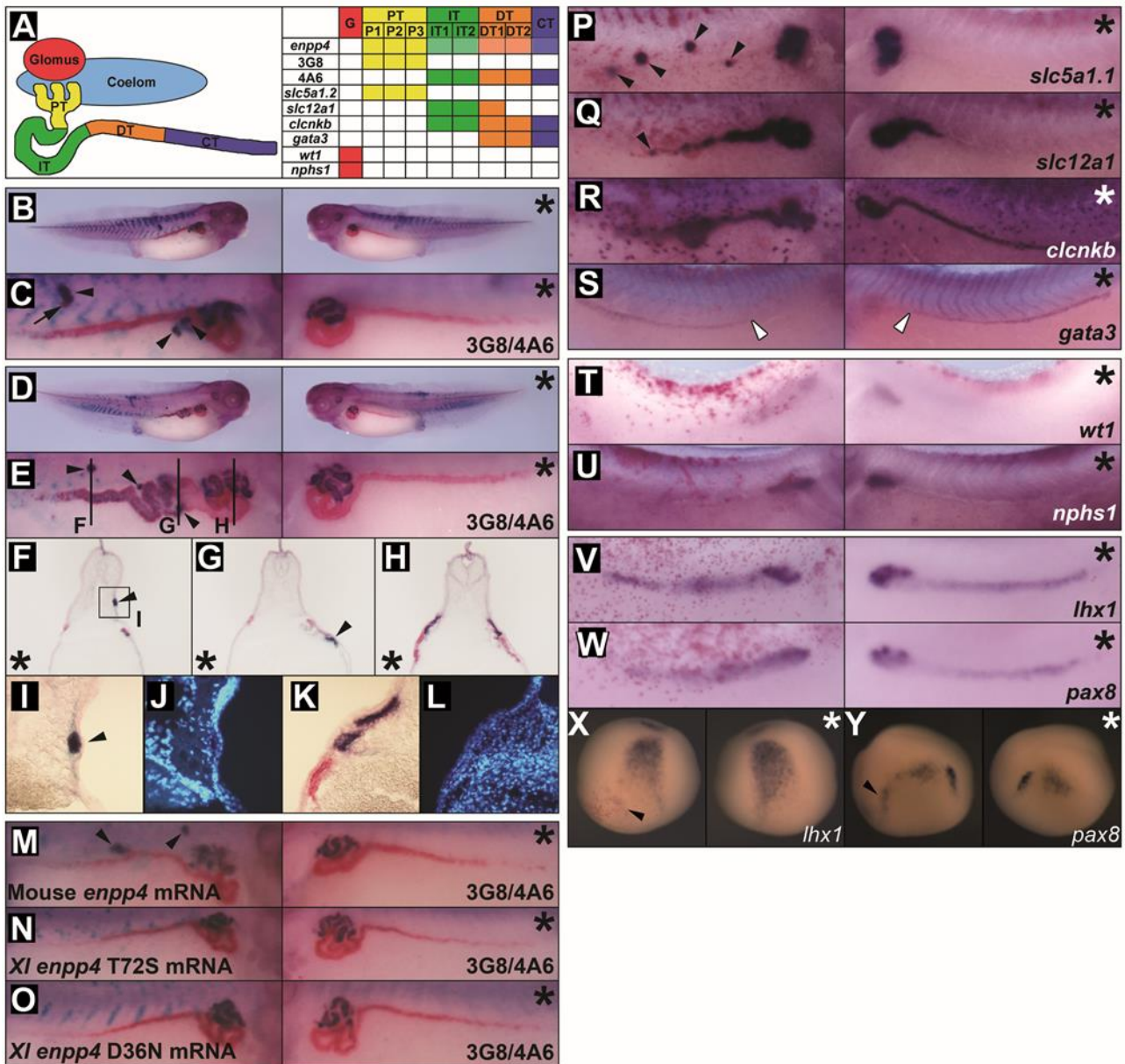
have been implicated in various physiological and pathological functions (19-21). In mammals, lipidic and purinergic pathways regulate metanephric physiology and their deregulation has been linked to renal pathologies (22-26). However, their potential roles during renal development have not been fully established, although S1P has recently been implicated during kidney branching (27). Several ectonucleotidases are expressed in the kidney, and some of them, like *enpp*6, are found in all 3 vertebrate kidney forms, emphasizing the roles of these molecules in kidney formation and physiology (11, 28, 29).

We have previously shown that *enpp*4 is highly expressed in the *X.laevis* pronephric tubules, providing the first temporal and spatial expression profile for this gene (11). We now present the only functional analysis carried out of this evolutionally conserved *enpp*4 protein and identifies its crucial roles during kidney development. We demonstrate that over-expression of wild type *enpp*4, but not an inactive enzymatic protein, induces the formation of ectopic pronephroi characterized by mostly the presence of proximal tubule markers but in rare occasion of more distal tubule markers. In contrast, *enpp*4 knock-down leads to kidney formation defects, demonstrating its expression is necessary for pronephros development. We show that these effects are mediated by the receptor *s1pr*5 and not by another *s1pr* or an *lpar* receptor suggesting that the kidney phenotype is not due to an increase of S1P or LPA in this tissue. We show that *enpp*4 specifically binds to the lipid phosphatidylserine, implying a role for bioactive lipids in pronephrogenesis. Finally, we provide evidence that *enpp*4 misexpression alters the expression of members of the Notch, Wnt and RA signalling pathways. We propose a model for the mechanisms of action for *enpp*4 and lipidic signalling in kidney development.

## Results

### Over-expression of *enpp*4 results in ectopic pronephric tubules formation

We have previously shown that *enpp*4 expression is detectable in *Xenopus* embryonic



**Fig.1. Over-expression of *enpp4* induces ectopic proximal pronephric tubules.** (A) Schematic diagram of pronephric structural components showing the expression domain for each marker used in this study (adapted from 31). G: glomus, PT: proximal tubule, IT: intermediate tubule, DT: distal tubule, CT: collecting tubule. (B-Y) Embryos targeted with 2ng of *enpp4* and 250pg of *LacZ* mRNAs were examined by 3G8/4A6 antibody staining (B-O) or whole mount *in situ* hybridization with the following probes: *slc5a1.1* (P), *slc12a1* (Q), *clcnkb* (R) and *gata3* (S) at stage 37/38; *wt1* (T) and *nphs1* (U) at stage 32; *lhx1* (V, X) and *pax8* (W, Y) at stages 28 and 14. (F-L) Transverse sections of the embryo shown in panels D and E were cut in the anterior-posterior registers indicated by lines in panel E. A higher magnification image (I) of ectopic pronephros in the somite indicated by square in (F) and of control kidney (K) and counterstained with Hoechst to indicate nuclei (J, L). Embryos targeted with 2ng of mouse wild type *enpp4* (M), *X.laavis* mutated in the putative catalytic site (N) or in the cation binding site (O) and 250pg of *LacZ* mRNAs were examined by 3G8/4A6 antibody staining. The asterisk denotes the uninjected side of each embryo. Arrowheads indicate ectopic marker staining. Blank arrowheads in S indicate the anterior limit of *gata3* expression.

kidney, especially in proximal pronephric tubules, by whole mount *in situ* hybridization (Fig. 1A, ref 11). To analyse potential functional roles of *enpp4* during pronephros development, embryos were co-injected with *enpp4* and the lineage tracer *lacZ* mRNAs as described in the methods and analysed by immunohistochemistry at stage 40-41 (Fig. 1B-O, Table S1). The monoclonal antibody 3G8

allows the detection of nephrostomes and proximal pronephric tubules whereas 4A6 is specific for intermediate and distal pronephric tubules (Fig. 1A) (30). The overall morphology of over-expressing embryos was normal. However, *enpp4* over-expression caused ectopic (in 23% of the analysed embryos, n=91) and enlarged regions (in 18% of the analysed embryos, n=91) of 3G8 staining

domain while ectopic 4A6 staining was rare (in only 2% of the analysed embryos; n=91), with enlarged more distal tubule staining being the predominant phenotype (in 20 % of the analysed embryos, n=91) (Fig. 1B-E). Statistical analysis confirmed that there are significant differences in pronephric phenotype between *enpp4* mRNA and *LacZ* mRNA injected embryos (N=148, p<0,001; Table S1B). Ectopic pronephroi were observed only when injections were performed into regions fated to become the lateral region of embryos (V2 blastomere, data not shown). *Enpp4* over-expressing embryos displaying ectopic 3G8 staining were analysed by transverse cryostat sectioning. 8 of the 9 ectopic tubules sectioned had epithelial tubule structure complete with a lumen (Fig. 1F-J) (n=5 embryos), which were similar in structure to normal pronephric tubules (Fig. 1K-L). Ectopic kidney structures with 3G8 (in 55 % of the analysed embryos, n=63) and 4A6 staining (in 11% of the analysed embryos, n=63) were also observed following mouse *enpp4* mRNA injection (Fig. 1M). Statistical analysis confirmed that there are significant differences in pronephric phenotype between mouse *enpp4* mRNA and *LacZ* mRNA injected embryos (N=120, p<0,001; Table S1B).

Constructs containing a point mutation in the putative catalytic domain (T72A, T72S) or metal cation binding domain (D36N, D189N), which should abrogate the enzymatic activity, were generated based on the similarity between *enpp4* and other *enpp* proteins (11). Injections of *enpp4T72S* mRNA reduced both 3G8 and 4A6 staining domains (in 22% and 21% of the analysed embryos respectively, n=66, Fig. 1N) and failed to induce any ectopic pronephric tubules. A similar phenotype was observed after *enpp4T72A* injection (Table S1A). Injections of *enpp4D36N* mRNA resulted in normal 3G8 (in 77% of the analysed embryos, n=69) and 4A6 (in 90% of the analysed embryos, n=69) staining pattern and no ectopic pronephros (Fig. 1O, Table S1A). Injections of *enpp4D189N* led to similar phenotypes (Table S1A). Statistical analysis confirmed that there are significant differences in pronephric phenotypes between mutant *enpp4* mRNA and wild type *enpp4* mRNA injected embryos (p<0,001; Table S1C).

These data suggest that ectopic pronephros formation caused by wild type *enpp4* mRNA injection depends on the catalytic activity of *enpp4*.

### Over-expression of *enpp4* disturbs proximal-distal patterning of pronephros

To further investigate this phenotype, embryos injected with *enpp4* mRNA were examined at stage 37 by whole mount *in situ* hybridization using pronephric specific markers, *slc5a1.1*, *slc12a1*, *clcnkb* and *gata3*, which mark the various proximal/distal tubule segments (5, 31) (Fig. 1A, 1P-S, Table S1). Injected embryos showed ectopic (in 30% of the analysed embryos, n=57) and enlarged (in 14% of the analysed embryos, n=57) staining of the proximal marker *slc5a1.1* domains (Fig. 1P). Interestingly, *enpp4* over-expression caused an increase in the region (in 25% of the analysed embryos, n=57), or ectopic (in 17% of the analysed embryos, n=57) expression of *slc12a1* a marker of intermediate tubules (Fig. 1Q). Injection of *enpp4* mRNA failed to induce any separate ectopic *clcnkb* expression although the normal domain of expression, the intermediate and distal tubules, was somewhat enlarged on the injected side (in 19% of the analysed embryos, n=58; Fig. 1R). The *gata3* expression domain, e.g. the distal and collecting tubules, was relatively normal, although the anterior limit of expression, determined relative to the somite number, was slightly more posterior in more than half of the injected embryos (in 58% of the analysed embryos, n=43; Fig. 1S). This might reflect a change in anterior/posterior patterning induced by *enpp4* over-expression. The statistical significance of these phenotypes was demonstrated by Fisher's Exact Test analysis and FDR multiple testing correction (p<0,001; Table S1B).

Injection of *enpp4* mRNA induced enlarged or reduced expression domains of glomus marker *wt1* in 34% and 22% of the analysed embryos at stage 33/34 (Fig. 1T, Table S1A). Similar phenotypes were observed using *nphs1* marker (Fig. 1U, Table S1A). Although the statistical significance of these phenotypes was demonstrated, we were not able to conclude on the exact *enpp4* effects on this structure (Table S1B). Ectopic

glomus was very rarely induced in injected embryos (in 0% for *wt1* and in 3% for *nphs1* of the analysed embryos, n=59 and 88 respectively).

Embryos injected with *enpp4* mRNA were also examined by whole mount *in situ* hybridization using early pronephros anlagen markers *lhx1* and *pax8*. At stage 28, expression of both *lhx1* and *pax8* was expanded especially in posterior parts of pronephric anlagen, with areas of intense staining consistent with that of the more anterior presumptive tubules (in 61% of the analysed *lhx1* stained embryos n=51 and in 70% of the analysed *pax8* stained embryos, n=50; Fig. 1V-W, Table S1A). The expansion of *lhx1* and *pax8* expression domains was also observed at early neurula stages (in 20% of the *lhx1* analysed embryos, n=46 and in 32% of the *pax8* analysed embryos, n=71, Fig. 1X-Y, Table S1). Interestingly, ectopic *pax8* expression, but not *lhx1*, was also induced following *enpp4* RNA injection at both stages analysed (in 25% of the analysed embryos at stage neurula and in 2% of the analysed embryos at stage 28, Table S1). Statistical analysis confirmed that there are significant differences in *pax8* pronephric expression domain between *enpp4* mRNA and *LacZ* mRNA injected embryos at both stages analysed (N=124 and 128, p<0,001; Table S1B). However, statistical analysis confirmed that there are significant differences in *lhx1* pronephric expression domain between *enpp4* mRNA and *LacZ* mRNA injected embryos only at stage 28 analysed (N=130, p<0,001; Table S1B). These data suggest that *enpp4* over-expression alters more early *pax8* than *lhx1* expression and that the expression of these two nephrogenic markers may be regulated by different pathways. This is in agreement with the fact that we observed no *irx1* expression alteration in *enpp4* over-expressing embryos (data not shown).

Since normal somite development is a prerequisite for pronephros development, *enpp4* RNA injected embryos were analysed by whole mount *in situ* hybridization using the muscle marker *myh4* at stage 33/34. The expression pattern was normal in all injected embryos (n=55; Fig. S1A, Table S1A). We also examined the expression of pan-mesoderm marker, *xbra* at stage

10.5. We were unable to find any significant statistical difference in *enpp4* mRNA injected embryos (n=46; Fig. S1B, Table S1B) compared to control *LacZ* injected embryos (n=52). Therefore, we conclude that, *enpp4* mRNA injection had no gross effects on mesoderm induction *per se* or on somite development.

Taken together, the results demonstrate that *enpp4* mRNA injection caused ectopic pronephric structures containing mostly domains of proximal and, in rare occasions, distal tubules marker genes. *Enpp4* over-expression also altered pronephros formation, leading to enlarged expression domains of markers of the entire tubule segments. This is consistent with the published expression domain of *enpp4*, which is not confined to the proximal tubules but also expressed, at a lower level, in the more distal tubules (11).

### **Morpholino knockdown of *enpp4* results in smaller pronephros formation**

To determine whether *enpp4* is required for normal pronephros development, we generated two anti-sense morpholino oligonucleotides (MOs) that specifically blocked the translation of *Xenopus enpp4* (Fig. S2A-C). Embryos were injected with 10 ng of *enpp4* MO1 or 2 alone or in combination and analysed as previously described (Fig. 2 and S2, Table S2A). The overall morphology of the embryos appeared normal. Injection of *enpp4* MO1 resulted in reduced expression of both 3G8 and 4A6 (in 65% and 28% of the analysed embryos respectively, n=107; Fig. 2A-B, Table S2A). A similar phenotype was observed following *enpp4* MO2 injection (in 49% and 24% of the analysed embryos respectively, n=87, Fig. S2F-G), indicating that a smaller pronephros had formed. Fisher's Exact Test analysis and FDR multiple testing correction confirmed that there are significant differences in pronephric phenotypes between *enpp4* MO1 or *enpp4* MO2 and control MO injected embryos (N=134 and N=114, p<0,001 or p<0,01; Table S2B). This phenotype was worsened when both MO were injected together (Fig.2C, Table S2A). Statistical analysis confirmed that there are significant differences in 4A6 phenotypes between *enpp4* MO1+MO2 and *enpp4*

MO1 or MO2 injected embryos (N=35 or N=36,  $p<0,001$ ; Table S2B). These results indicate that *enpp4* is required for both proximal and distal pronephric tubule development.

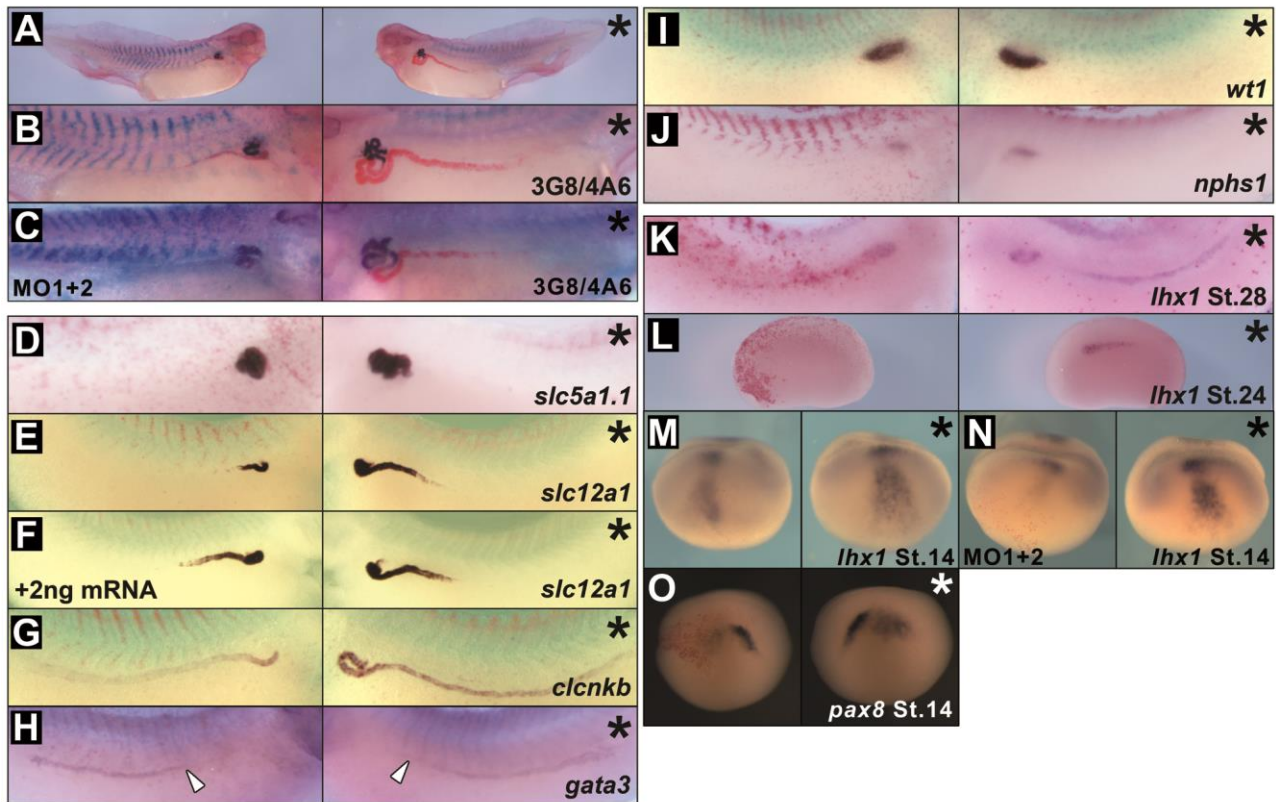
To address the functional roles of *enpp4* in more detail, *enpp4* MO1 injected embryos were examined for *slc5a1.1*, *slc12a1*, *clcnkb* and *gata3* expression at stage 37/38. As shown for the immunohistochemical markers, injected embryos showed a significant reduced expression of *slc5a1.1*, *slc12a1* and *clcnkb* at similar frequencies (in 58%, 56% and 53% of the analysed embryos, n=64, 75 and 40 respectively; Fig. 2D, E and G, Table S2). Statistical analyses confirmed that there are significant differences in expression domains for these three markers between *enpp4* MO1 and control MO injected embryos (N=98,  $p<0,001$  and N=122,  $p<0,001$  and N=95,  $p<0,01$ , Table S2B). Similar reduction of *slc5a1.1* (in 32% of the analysed embryos, n=38) and *slc12a1* (in 14% of the analysed embryos, n=28) expression was observed with *enpp4* MO2 (Fig. S2H-I), and significant differences for *slc5a1.1* expression domain were confirmed between *enpp4* MO2 and control MO injected embryos (N=72,  $p<0,001$ ; Table S2B). To confirm the specificity of the knock-down of *enpp4* expression on pronephric development, co-injection of 2ng of mouse *enpp4* mRNA with 10ng of *enpp4* MO1 or MO2 was performed (Fig. 2F, Fig.S2J). This rescue partially restored the normal phenotype with more embryos displaying a normal *slc12a1* staining domain (65% and 50%, n=72 and 28 respectively) and fewer embryos displayed the reduced *slc12a1* staining domain (24% and 0%, n=72 and 28 respectively). However, some embryos displayed ectopic *slc12a1* expression (11% and 50% respectively) consistent with the over-expression phenotype. Therefore, the significant differences between rescue and morphant embryos may be due to this last phenotype (N=147 and 56,  $p<0,001$ ; Table S2B). The *gata3* anterior expression domain limit was also affected following *enpp4* MO injection (in 31% of the analysed embryos, n=42; Fig. 2H, Table S2), although this alteration was not statistically different between *enpp4* MO1 and control MO injected embryos (Table S2B). These results suggest that *enpp4* knock-down affected whole pronephros

differentiation rather than just the proximal-distal patterning of pronephric tubule segmentation.

As expected from the *enpp4* *in situ* hybridization expression (11), *enpp4* knock-down has no statistically significant effect on glomus formation (Table S2B). The expression of *wt1* and *nphs1* was normal in most of *enpp4* MO1 injected embryos at stage 33/34 (in 94% of the analysed *wt1* stained embryos, n=34 and in 83% of the analysed *nphs1* stained embryos, n= 41; Fig. 2I-J, Table S2A).

The expression of the early marker *lhx1* of pronephric development was also affected following *enpp4* MO injection. At stage 28, expression of *lhx1* was reduced especially in posterior elements of the pronephric anlagen (in 35% of the analysed embryos, n=23; Fig. 2K, Table S2A), although its expression in presumptive proximal tubules was sometimes unaffected or expanded. At stage 24, the expression domain of *lhx1* was clearly reduced (in 75% of the analysed embryos, n=20; Fig. 2L, Table S2A), suggesting involvement of *enpp4* in early pronephros differentiation. Injection of *enpp4* MO2 injection caused similar phenotypes at both stages (in 30% of the analysed embryos at stage 28, n=20 and in 55% of the analysed embryos at stage 24, n=20; Fig. S2K-L, Table S2A). At early neurula stages, expression of *lhx1* was also reduced following *enpp4* MO1 or MO2 (37% of the analysed embryos, n=46; 64% of the analysed embryos, n=61 respectively) and even absent after MO1 injection (in 31% of the analysed embryos, n=46) (Fig.2M, Fig.S2M, Table S2A). Statistical analyses confirmed there are significant differences in *lhx1* expression domain between *enpp4* MO1 and control MO injected embryos at the three analysed stages (N=44,  $p<0,01$ ; N=40,  $p<0,05$  and N=85,  $p<0,001$ ; Table S2B). A similar statistically significant phenotype was also observed on *pax8* expression at the neurula stages following *enpp4* MO1 or MO2 injection (Fig.2O, Fig.S2N) (Fisher's Exact Test and FDR multiple testing correction, N=97,  $p<0,001$  and N=46,  $p<0,001$ ; Table S2B). The injection of both MO resulted in a stronger reduction in *lhx1* expression with only 16% of the injected embryos (n=31) displaying an





**Fig.2. MO knockdown of *enpp4* expression disrupts pronephros formation.** Embryos targeted with 10ng of *enpp4* MO1 or 10 ng of both *enpp4* MOs (C, N) and 250pg of *lacZ* mRNA were examined by 3G8/4A6 antibody staining (A-C) or whole mount *in situ* hybridization with the following probes: *slc5a1.1* (D), *slc12a1* (E-F), *clcnkb* (G) and *gata3* (H) at stage 37/38; *wt1* (I) and *nphs1* (J) at stage 32, *lhxl* (K-N) at stages 28, 24 and 14, *pax8* (O) at stage 14. The embryo shown in (F) was co-injected with 2ng of mouse *enpp4* mRNA to rescue the MO knock-down. The asterisk denotes the control, uninjected side of each embryo. Blank arrowheads in (H) indicate the anterior limit of *gata3* expression.

unaffected *lhxl* expression domain (Fig. 2N, Table S2A). Statistical analysis confirmed that there are significant differences in *lhxl* expression between *enpp4* MO1+MO2 and *enpp4* MO2 injected embryos (N=92,  $p < 0.01$ ; Table S2B).

The expression pattern of *myh4* and *xbra* was unaffected in *enpp4* MO1 injected embryos (in 100% of the *myh4* analysed embryos,  $n=47$ ; Fig. S2D and in 84% of the *xbra* analysed embryos,  $n=19$ ; Fig. S2E) suggesting that both mesoderm and somite development were normal.

Taken together, the MO knock-down experiments demonstrate that normal levels of *enpp4* are required for early normal pronephric development. To address if the ectonucleotidase *enpp6*, which is also expressed in the proximal pronephric tubules (11), can compensate for *enpp4* loss of function, we performed *enpp4/enpp6* double knockdown experiments (Fig.S3, Table S2). The co-injection of *enpp4* MO2 and *enpp6* MO

resulted in the formation of reduced 3G8 and 4A6 positive tissues, phenotypes similar to the effects of *enpp4* MO2 injection (Fig.S3A-3B, Table S2). This data demonstrate that the injection of *enpp6* MO did not worsen the renal phenotype caused by *enpp4* knockdown, even if the *enpp6* depletion induced the formation of a smaller pronephros on the injected side (Fig. S3C). The statistical analyses did not show any significant differences in pronephric phenotypes between *enpp4* MO2+*enpp6* MO and *enpp4* MO2 injected embryos (N=144) and between *enpp4* MO2+*enpp6* MO and *enpp6* MO injected embryos (N=142) (Table S2B). Moreover, co-injection of 2ng of *X.laevis enpp6* mRNA did not rescue but worsened the *enpp4* MO phenotype (Fig.S3D). This suggests that there is no functional redundancy between *enpp4* and *enpp6*.

The morphology of the somites in *enpp4* MO1 treated embryos appears normal and no effects on somites (*myh4*) or early mesoderm (*xbra*)

markers expression are observed. We are therefore confident that the kidney phenotypes observed following *enpp4* knockdown are not due to general mesoderm defects. Moreover, the kidney phenotypes in this study are phenotypes already published as direct effects of MOs and therefore not due to delays in development induced by *enpp4* MO injections (e.g. 32-33).

#### ***enpp4* over-expression up regulates expression of components of the RA, Notch and Wnt signalling pathways.**

Since RA, Notch and Wnt signalling pathways are involved in pronephros formation and patterning (32-38) and the timing of the endogenous expression of many components of these pathways overlapped, we hypothesized that *enpp4* might affect these pathways. We therefore chose representative members, e.g. ligands, receptors and metabolic enzymes, of these families based on the current literature and probe availability. Embryos were injected with *enpp4* mRNA (Fig. 3A-G, Table S3) or *enpp4* MO1 (Fig. 3H-N, Table S3) and examined by *in situ* hybridization for alterations in expression domains of the chosen components of these three pathways following these targeted injections.

*Enpp4* mRNA injected embryos showed ectopic and enlarged *raldh1a2* expression domains in the pronephric region (in 35% and 22% of the analysed embryos respectively, n=37; Fig. 3A, Table S3A), while MO injection resulted in reduced areas of expression (in 25% of the analysed embryos, n=33; Fig. 3H). Neither *enpp4* mRNA nor MO injection affected *raldh1a2* expression in the pharyngeal arches. *Enpp4* over-expression also caused ectopic and enlarged *rdh10* expression domains (in 12% and 35% of the analysed embryos respectively, n=34, Fig. 3B), while MO injected embryos shown reduced expression (21%, n=33; Fig. 3I). Both mRNA and MO injection disturbed *rdh10* expression in the somites. *Cyp26a1* expression in the pronephric region, but not in the somites, was normal in embryos injected with both *enpp4* mRNA and MO (in 98% and 88% of the analysed embryos, n=44 and 42 respectively; Fig. 3C, J, Table S3A). The

statistical analysis did not show any significant differences in *cyp26a1* staining domain between *enpp4* MO1 and control MO injected embryos (N=88). However, a similar analysis demonstrated the significant differences in *raldh12a2* and *rdh10* expression domains between *enpp4* MO1 and control MO injected embryos (N=68, p<0,05 and N=80, p<0,01; Table S3B). These results suggest *enpp4* might act upstream of RA signalling, potentially by controlling the expression of genes involved in RA synthesis.

*Enpp4* mRNA injected embryos predominantly showed enlarged expression domains of *notch1* (in 53% of the analysed embryos, n=75), but some embryos showed reduced and occasionally ectopic staining with lower frequency (17% and 7% respectively, n=75; Fig. 3D, Table S3A). *Notch1* expression was normal in the majority of MO injected embryos (80%, n=41; Fig. 3K). However, some embryos display enlarged or reduced expression domains and statistical analysis confirmed there are significant differences in *notch1* expression between *enpp4* MO1 and control MO injected embryos (N=81, p<0,05; Table S3B). *Enpp4* mRNA injection caused ectopic and enlarged expression domains of *dll1* (in 40% and 23% of the analysed embryos respectively, n=81; Fig. 3E), while MO injected embryos showed reduced expression (33%, n=46; Fig. 3L). Ectopic and enlarged *jag1* expression domains were observed following *enpp4* over-expression (in 20% and 44% of the analysed embryos respectively, n=81; Fig. 3F), while MO1 injection reduced its expression domain (38%, n=42; Fig. 3M). Statistical analyses confirmed there are significant differences in *dll1* and *jag1* expression domains between *enpp4* MO1 and control MO injected embryos (N=86, p<0,05 and N=83, p<0,001, Table S3B). These results suggest that *enpp4* also regulates members of the Notch signalling and that *jag1* expression is more affected by *enpp4* depletion than *dll1*.

Since we have also demonstrated that *rnfg* over-expression caused ectopic pronephroi formation (33), we further addressed the link between *enpp4* and the Notch pathway by injecting *enpp4* mRNA or MO2 in presence of *rnfg* mRNA





**Fig.3. Microinjection of *enpp4* mRNA and MO affect the expression of retinoic acid synthesis enzymes, notch and wnt signalling molecules.** Embryos targeted with 2ng of *enpp4* and 250pg of *LacZ* mRNA (A-G) or 10ng of *enpp4* MO and 250pg of *LacZ* mRNA (H-N) were fixed at stage 28 and examined by whole mount *in situ* hybridization with the following probes: *raldh1a2* (A, H), *rdh10* (B, I), *cyp26a1* (C, J), *notch1* (D, K), *dll1* (E, L), *jag1* (F, M) and *wnt4* (G, N). The asterisks denote the control, uninjected sides. Arrowheads indicate ectopic staining of the marker gene.

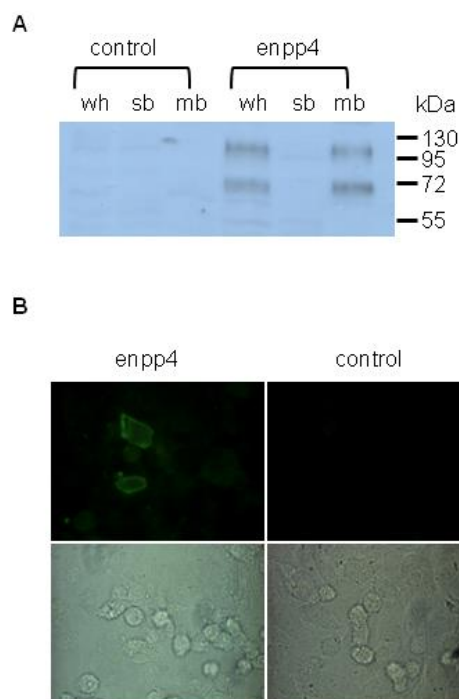
or MO (Figure S4, Table S3). Although the data are not statistically significant, injection of *rfng* MO increased the percentage of embryos displaying ectopic 3G8 and 4A6 staining caused by *enpp4* mRNA injection (41% and 14% respectively, n=37; Fig.S4A; compared to 23% and 10%, n=33; Fig.S4B, Table S3). Furthermore, the size and number of these ectopic pronephroi found in each embryo, especially shown by 3G8 staining, was higher than with co-injection of *enpp4* mRNA and cMO. Co-injection of *rfng* mRNA and *enpp4* MO has the opposite effect, lowering the numbers of embryos displaying ectopic 3G8 and 4A6 expression caused by *rfng* over-expression (27% and 13% respectively, Fig.S4C-D compared to 38% and 19% respectively, Fig.S4E, Table S3). Furthermore, this co-injection resulted in a strong reduction of 3G8 staining (in 60% of the analysed embryos respectively, n=15, Fig.S4D, Table S3). These data demonstrate that *enpp4* interacts with the Notch signalling pathway during pronephrogenesis and that modulation of Notch-ligand interactions by fringe proteins alters *enpp4* function during pronephrogenesis.

*Enpp4* mRNA injected embryos showed enlarged and ectopic *wnt4* expression domains (in 32% and 17% of the analysed embryos respectively, n=41, Fig. 3G, Table S3A). Expression of *wnt4* was reduced in most of the *enpp4* MO1 injected embryos (82%, n=33, Fig. 3N), although this phenotype was also observed in *enpp4* over-expressing embryos (27%). Statistical analysis confirmed that there are significant differences in *wnt4* expression domain between *enpp4* MO1 and control MO injected embryos (N=66, p<0,001, Table S3B). These data suggest that *enpp4* is necessary and sufficient for promoting pronephric *wnt4* expression.

### Enpp4 is localized to the plasma membrane

Our published sequence analysis suggests that *enpp4* is a transmembrane protein (11). To further characterize the amphibian *enpp4* protein, we generated a specific polyclonal antibody against the full length *Xenopus* protein. To address the cellular localization of *enpp4*, *Xenopus* wild type (WT), T72S mutant and mouse *enpp4* cDNA were expressed in CHO cells by transient transfection. By Western Blotting analysis using the anti-

*Xenopus* enpp4 antibody, *Xenopus* enpp4 WT protein was detected in whole cells and in the membrane fractions, but not in the soluble fractions (Fig. 4A). The same results were obtained for the mouse enpp4 and the *Xenopus* enpp4T72S proteins (data not shown). Surprisingly, the protein was detected with an apparent molecular mass of 70kDa, although its predicted molecular mass is 51kDa (Fig. S1). Mass spectrometry analysis of the gel confirmed the specificity of our polyclonal antibody, by clear identification of *Xenopus* enpp4 protein at 70kDa in the membrane fractions from CHO cells transfected with *Xlenpp4*-pCDNA3.1 and not from CHO cells transfected with the empty pcDNA3.1 plasmid (data not shown). The band detected with an apparent molecular mass of 100 KDa was not further analysed as it was not always detected and may correspond to either a dimer or to a post-translational modification. The fluorescent image of CHO cells expressing *Xenopus* and mouse enpp4 (data not shown) shows it is localized in plasma membrane confirming the findings of Möller *et al.*, 2007 (39) (Fig. 4B).



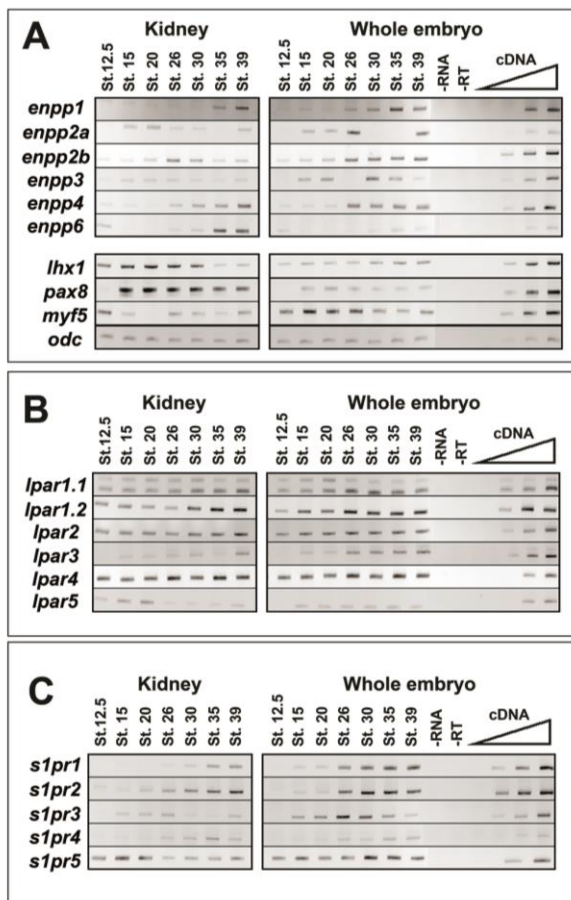
**Fig.4. Enpp4 is a transmembrane ectonucleotidase.** CHO cells were transfected with *enpp4*-pCDNA3.1 or empty vector (control) and the cellular distribution of enpp4 determined by Western Blotting (A) using proteins extracts from membrane (mb), soluble (sb) or whole cells (wh) fractions (A) or by immunocytochemistry (B) using anti-Xlenpp4 antibody. Immunofluorescence and corresponding brightfield images were recorded (400x).

## Phospholipid receptors are expressed in the developing pronephros along with the *enpp4* gene.

As enpp4 protein is more related to the lipid-hydrolysing enpp6 and 7 enzymes (11), we hypothesized that the roles of transmembrane-bound enpp4 during pronephrogenesis might be linked to the lipidic signalling pathway. To test if these receptors might mediate enpp4 functions, we established the expression profiles of the *Xenopus laevis* phospholipid *lpa* and *s1p* receptor family members, identified in our previous study (40), by RT-PCR at key stages during kidney development in dissected developing pronephric tissues and contrasted it with expression of the *enpp* family members (Fig. 5A-C). The expression profile of the *enpp* genes is in agreement with our published *in situ* hybridization data and confirms the expression of *enpp1*, *enpp2b*, *enpp4* and *enpp6* during pronephrogenesis (11). Interestingly, weak expression of *enpp4* and *enpp6* are first detected in the embryonic kidney from stage 12.5 and both are upregulated by stage 26 and 30 respectively. This confirms the potential involvement of the enpp4 protein during early pronephros development phases. This early expression of enpp4 in pronephric tissue was not detected by *in situ* hybridization in our previous study (11), but it is an accepted fact that detection of gene expression patterns by this technique is relatively insensitive. All *lpa* receptors, except *lpar3* and 5, are expressed in pronephric tissues at a similar level from the time of kidney specification to late differentiation, confirming their ubiquitous expression profile during *Xenopus* embryogenesis (40). The *s1p* receptors display different expression profiles, with *s1pr5* being the only family member to be expressed in the developing kidney at every stage analysed, especially in the presumptive pronephric tissue at stage 12.5. No such renal expression was detected by *in situ* hybridization in our previous study (40). This suggests that the pronephric level of expression of these lipidic receptors, especially *s1pr5*, is relatively low, under the *in situ* hybridization detection level.

A novel *s1pr5* gene was recently identified by *X.laevis* genome sequencing. Sequence analysis

studies revealed the two *s1pr5* proteins share 96% of identity, suggesting these two *s1pr5* genes are homeologs. According to the *Xenopus* gene nomenclature guidelines, we named this new gene *s1pr5.b* and the published *s1pr5* gene (40), *s1pr5.a* gene. RT-PCR experiments demonstrate that *s1pr5.b* displays a more restricted expression profile in the adult frog than its homeolog gene (Fig.S6A, ref 40). However, the two *s1pr5* genes display a very similar expression profile during *X.laevis* embryogenesis and are both expressed in the pronephric tissues (Fig.S6B).



**Fig.5. The *enpp* and the lipidic receptors, the *lpar* and *s1pr*, gene family members are expressed in the pronephros.** Developing pronephric anlagen or pronephric tubules were dissected as indicated, from whole *X. laevis* embryos and total RNA extracted. RT-PCR was performed on pronephric dissected tissues and control whole embryos along with negative and linearity controls. (A) Comparative expression pattern of the *enpp* genes and pronephric and muscle marker genes controlling the quality of the dissections (B) Comparative expression profile of the *lpa* receptors (C) Comparative expression profile of the *s1pr* genes.

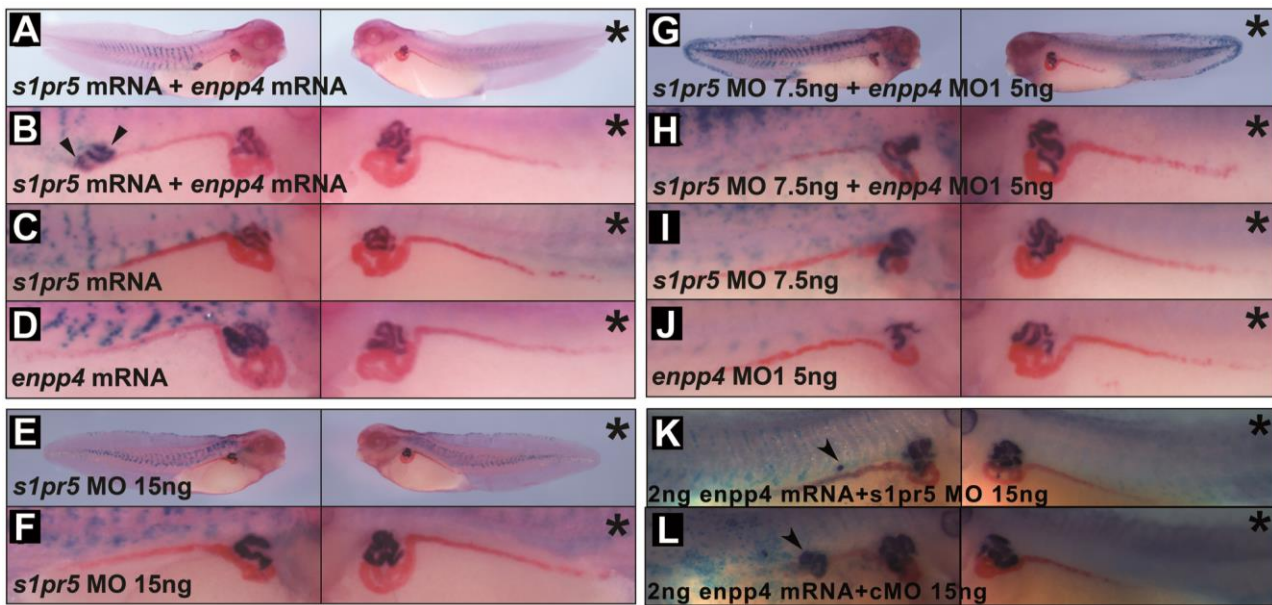
### Over-expression of *s1pr5* enhances *enpp4* function to induce ectopic pronephros

In order to identify whether a lipidic receptor is involved in the kidney phenotype induced by *enpp4* misexpression, *s1pr* and *lpar* over-expression analyses were carried out as described previously and kidney phenotypes assessed by 3G8 and 4A6 antibody staining. 2ng of *s1pr5.a*, *s1pr1*, *lpar1.1* and *p2y10* mRNAs were injected alone or in combination with 1ng of *enpp4* mRNA, half the amount used in optimized conditions to generate ectopic pronephros (Fig. 6A-D and S4A-F, Table S4). Only *s1pr5.a* mRNA co-injected with *enpp4* mRNA resulted in ectopic 3G8 and 4A6 staining (in 38% and 9% of the analysed embryos respectively, n=89; Fig. 6A-B; compare to Fig. S4A, C, E). Furthermore the size and frequency of the ectopic pronephroi was higher than with injections of 2ng of *enpp4* alone (Fig. 1B-E). Statistical analysis confirmed that there are significant differences in 3G8 and 4A6 expression domains between *enpp4*+*s1pr5.a* mRNAs and *enpp4* mRNA injected embryos (n=183, p<0,001 and p<0,01; Table S4B). Injection of *s1pr5.a* mRNA alone resulted in no ectopic kidney formation with normal 3G8 and 4A6 staining in the majority of the embryos (73% and 81% respectively, n=52; Fig. 6C) whereas embryos injected with 1ng of *enpp4* mRNA alone showed ectopic staining in rare cases (3G8; 5% and 4A6; 5% respectively, n=94; Fig. 6D), explaining the observed ectopic kidney tissues in the other co-injection experiments (Table S4A) and the statistical differences in pronephric phenotype between the receptor and *enpp4* mRNAs and the receptor mRNA injected embryos (Table S4B). These results indicate that the presence of *s1pr5* enhanced *enpp4* function to generate ectopic pronephros and that neither of the other receptors tested displayed this activity.

### The functions of *enpp4* are mediated by the lipidic *s1pr5* receptor

To further confirm that *s1pr5* is involved in pronephros development, we generated an anti-sense MO against *Xenopus s1pr5.a* and *s1pr5.b* (Fig. S4G-H and S6C-D). Embryos injected with





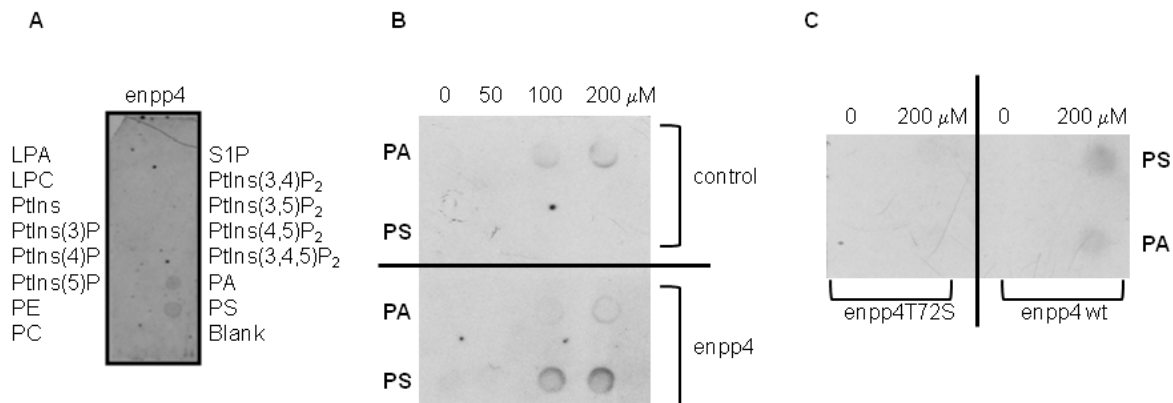
**Fig.6. Enpp4 pronephric functions are mediated by the *slpr5* receptor.** Injected embryos were examined by 3G8/4A6 antibody staining. Double targeted injection of 2ng *s1pr5.a* mRNA and 1ng of *enpp4* mRNA (A-B), single targeted injection of *s1pr5.a* (C) or of *enpp4* (D) mRNA. Embryos injected with 15ng of *s1pr5.a* MO (E-F). Double targeted injection of 7.5ng of *s1pr5.a* MO and 5ng of *enpp4* MO1 (G-H), single targeted injection of *s1pr5.a* MO (I) or of *enpp4* MO1 (J). Double targeted injection of 15ng of *s1pr5.a* MO and 2ng of *enpp4* mRNA (K) and 15ng of cMO and 2ng of *enpp4* mRNA (L). An asterisk denotes the control uninjected side. An arrowhead indicates ectopic 3G8 staining.

15ng of *s1pr5.a* MO displayed reduced 3G8 (in 37% of the injected embryos, n=43) and 4A6 staining (in 60% of the injected embryos, n=43) Fig. 6E-F, Table S4). Similar phenotypes were observed following the injection of 15ng of *s1pr5.b* MO (Fig. S6E, Table S4A). These phenotypes are similar to the effects of *enpp4* MOs injection. Statistical analyses confirmed that there are significant differences in 3G8 expression domain between *s1pr5.a* or *s1pr5.b* MO and control MO injected embryos (N=104 and N=133,  $p<0,001$ ; Table S4B). A similar analysis demonstrated there are significant differences in 4A6 expression domain between *s1pr5.a* or *s1pr5.b* MO and control MO injected embryos (N=104,  $p<0,001$  and N=133,  $p<0,01$ ; Table S4B). These results suggest that *slpr5.a* and *slpr5.b* are required for normal pronephros formation in *Xenopus*. As both MO can alter the translation of both *s1pr5* receptor genes (Fig.S6D), the phenotypes observed following injection of a single *s1pr5* MO are unlikely due to partial depletion of *s1pr5* functions.

To examine potential synergistic effects, we carried out co-injection of 7.5ng of *s1pr5.a* MO together with 5ng of *enpp4* MO1, half the concentration optimized for use in single injections (Fig. 6G-J, Table S4). By comparison, embryos

injected with 7.5ng of *s1pr5.a* MO and 5ng of control MO and embryos injected with 5ng of *enpp4* MO1 and 7.5ng of control MO were also analysed. As expected, embryos co-injected with *s1pr5.a* and *enpp4* MOs generated the strongest phenotype and smallest pronephros, with strong reduction of 3G8 and 4A6 staining domains (in 74% and 81% of the analysed embryos respectively, n=42; Fig. 6G-H). *Enpp4* MO alone also caused strongly reduced 3G8 and 4A6 staining as previously shown (in 65% and 60% of the analysed embryos respectively, n=40; Fig. 6J), while the *s1pr5.a* MO alone reduced pronephric size in both 3G8 and 4A6 domains, less frequently (in 22% and 29% of the analysed embryos respectively, n=51; Fig. 6I). Although there are no significant differences in pronephric phenotype between *enpp4* MO1+*s1pr5.a* MOs and *enpp4* MO1 injected embryos, we concluded that co-injection of *s1pr5.a* and *enpp4* MOs showed additive effects on the inhibition of *Xenopus* pronephros development based on the size of the scored pronephros.

To further analyse the link between *enpp4* and *s1pr5*, we carried out injection of 2ng of *enpp4* mRNA together with 15ng of *s1pr5.a* MO (Fig.6K-L). Embryos co-injected with 2ng of *enpp4* mRNA



**Fig.7. Enpp4 specifically binds to the lysophospholipid, phosphatidylserine.** PIP strip<sup>TM</sup> was incubated with membrane protein extracts from enpp4 over-expressing CHO cells and the bound enpp4 protein detected with anti-Xlenpp4 serum (A). Nitrocellulose membranes were spotted with increasing amount of PA or PS and incubated with membrane protein extracts from CHO cells transfected with *enpp4*-pcDNA3.1, with *enpp4*T72S-pcDNA3.1 or empty plasmid (control) and the bound proteins detected with anti-Xlenpp4 serum (B-C). Abbreviations: LPA: lysophosphatidic acid; LPC: lysophosphocholine; PA: phosphatidic acid; PC: phosphatidylcholine; PE: phosphatidylethanolamine; PS: phosphatidylserine; PtlIns: phosphatidylinositol; S1P: shingosine-1-phosphate.

and 15ng of control MO were also analysed. As expected, injection of *s1pr5.a* MO lowered the percentage of embryos displaying ectopic 3G8 and 4A6 staining caused by *enpp4* mRNA injection (17.5% and 0% respectively, n=40; Fig.6K; compared to 48% and 10%, n=50; Fig.6L). Furthermore, the size and number per embryos of these ectopic pronephroi was lower than with injection of 2ng of *enpp4* and 15ng of cMO. Statistical analysis confirmed that there are significant differences in 3G8 expression domain between *enpp4* RNA+*s1pr5.a* MO and *enpp4* RNA+control MO injected embryos (n=90, p<0,01) and that depletion of *s1pr5.a* receptor inhibits significantly the formation of ectopic proximal tubules formation caused by *enpp4* over-expression (Table S4B). These data indicate that the ectopic pronephric tissues induced by *enpp4* over-expression are due to the activation of the *s1pr5* receptor.

### Enpp4 specifically interacts with the lysophospholipid phosphatidylserine

To assess if *enpp4* hydrolyses lipids and generates a ligand, which could bind to the *s1pr5* receptor, phospholipid binding was tested by protein lipid overlay assay using commercial pre-spotted lipid membranes. Membranes were incubated with membrane proteins fractions from CHO cells transfected with *Xlenpp4*-pcDNA3.1 and then probed with the anti-*Xenopus* *enpp4*

antibody. Out of the 26 bioactive lipids tested, only phosphatidylserine (PS) and phosphatidic acid (PA) bound *Xenopus* *enpp4* (Fig. 7A and data not shown). Further analysis showed that only PS is specifically bound by *Xenopus* *enpp4* since control CHO cells transfected with the empty pcDNA3.1 vector protein fractions bound to PA (Fig. 7B). Moreover, this interaction is abolished when the putative catalytic site is mutated as no specific binding to PS is observed with membrane proteins fractions from CHO cells transfected with *Xlenpp4*T72S-pcDNA3.1 (Fig.7C). This data suggests that *enpp4* specifically interacts with PS and might be involved in lipid metabolism. We then tried to determine the enzymatic activity of *Xenopus* *enpp4*. However, we could not detect any lipid derivatives, e.g. DAG, PA or LysoPS, which could be generated from the hydrolysis of PS in the membrane proteins fractions from CHO cells over expressing *enpp4*. These data suggest that *enpp4* does not have PLA, PLC or PLD activity towards PS.

### Discussion

This paper reports newly identified and unexpected roles of the ectonucleotidase *enpp4* during vertebrate kidney development. Although this protein has been conserved during evolution, no data regarding its physiological functions has been reported. Our work provides the first evidence *in vivo* of a key developmental function for this

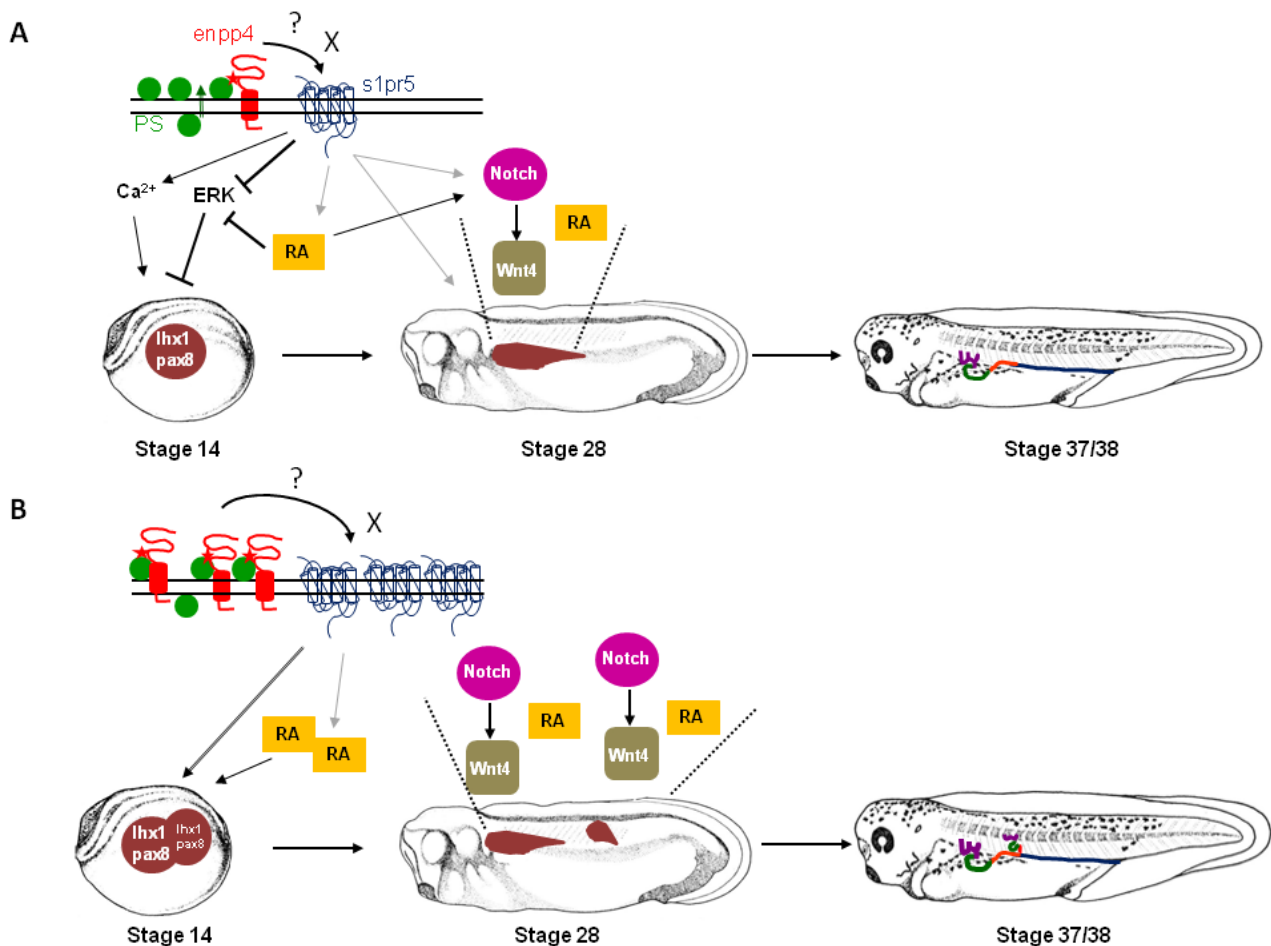
protein during nephrogenesis and emphasizes the importance of the lipidic pathways in the kidney. Moreover, our findings bring a novel mechanistic understanding for pronephric development (Fig. 8).

We previously demonstrated that *enpp4* is expressed from tadpole stages (11), but our present data demonstrate that low but significant levels of *enpp4* can be detected at the time of proximal tubule specification (41). Moreover, our data demonstrates that *enpp4* is involved in the early phases of kidney development by regulating the expression level of two of the early nephrogenic transcription factors, *lhx1* and *pax8*. As *lhx1* is necessary for the early patterning of the entire kidney and subsequently growth and elongation in the development of the pronephric tubules (42, 43), the reduction of *lhx1* expression can explain the formation of the small pronephros in *enpp4* MO injected embryos. We also demonstrate that *enpp4* is sufficient to generate kidney, but only from lateral mesoderm and not in ectopic non-lateral positions. This is in agreement with the failure to detect any pronephric tissues in animal caps over-expressing *enpp4* (data not shown). This suggests that the lateral mesoderm must contain either the receptor or the substrate necessary for *enpp4* function.

The ectopic kidneys formed from *enpp4* over-expression consist of tubular structures and are patterned along their proximal/distal axis. Moreover, in some rare cases, there is a complete mini-duplication of the entire pronephros. This surprising phenotype could be explained by the up-regulation of the patterning Wnt, Notch and RA signalling pathways member expression by *enpp4*. As *lhx1* and *pax8* may be direct targets of RA signalling (36), the activation of these early pronephric markers by *enpp4* over-expression via RA signalling increase could lead to the formation of ectopic pronephroi (44). Subsequently, RA increase could pattern these ectopic tubules, as it has been recently shown that an RA gradient regulates zebrafish pronephric nephron segmentation patterning (37). However, in *Xenopus* pronephros, RA signalling increases expression level of distal tubules markers,

suggesting this signalling pathway promotes distal tubules formation (45). Moreover, RA signalling also regulates the expression of members of the Notch pathway (46), which can subsequently activate *wnt4* expression (33), which then functions to pattern the proximal pronephros. Our data demonstrate that *rnfg* is involved in mediating *enpp4* signalling, probably by its ability to modify Notch-ligand interactions (47). Therefore, we can speculate that *enpp4* acts upstream or in parallel to RA signalling which acts upstream of Notch and Wnt signalling pathways (see model Fig.8). As *enpp4* expression was unchanged in animal caps treated with RA compared to control caps (data not shown), this supports the hypothesis that *enpp4* might act upstream of the RA signalling pathway.

A key question is how the mis-expression of *enpp4*, an ectonucleotidase, can alter gene expression. Phosphatidylserine translocation from the inner leaflet to the outer leaflet of the cell membrane is a well-known indicator of apoptosis (48). However, recent studies have shown that transient and reversible cell surface PS distribution can be part of physiological and developmental processes such as myotube formation during muscle differentiation (49). Therefore, *enpp4* could bind to PS in the extracellular space during physiological pronephric development. The enzymatic activity of transmembrane-bound *enpp4* is essential for the renal phenotype, suggesting that the kidney phenotypes are due to an excess or shortage of *enpp4* generated products in the extracellular space inducing cell responses via the activation of the *s1pr5* lipidic receptor. However, our biochemical evidences strongly suggest that the *enpp4* kidney phenotype is not linked to either the ligand phospholipid LPA or S1P. Moreover, no additive effects between *enpp4* and the LPA and S1P activated *lpa1.1*, *p2y10* and *s1pr1* receptors (19) were observed and lipid soaking or lipid-coating beads implantation experiments failed to reproduce the ectopic pronephroi phenotype induced by *enpp4* over-expression (data not shown). Finally, the mis-expression of *enpp6* enzymes generating S1P (28) resulted in completely different phenotypes to those caused by *enpp4* mRNA and MO injection.



**Fig.8. Proposed model of how enpp4/s1pr5 controls pronephros patterning.** During normal pronephric development (A), in the extracellular space, enpp4 binds to the phosphatidylserine close to or in its catalytic site ( ) which can then either interact with the s1pr5 or produce a novel ligand X, able to bind to this receptor. The activation of s1pr5 leads to the up-regulation of *lhx1/pax8* pronephric markers in the kidney field either by acting upstream of RA signalling pathway or by acting directly *via* the ERK or calcium pathways. High RA levels will then activate Notch pathway and subsequently *wnt4* expression in the proximal pronephric regions, whereas RA will promote distal tubules formation. The mechanism by which s1pr5 activation directs the expression domains of these genes remains to be confirmed. Enpp4 and s1pr5 over-expression (B) leads to expanded and ectopic expression domains for both the Notch and RA pathway genes and *wnt4*. These changes in patterning gene expression domains induce the formation of enlarged pronephric segments and ectopic pronephric tubules.

The fact that the observed kidney phenotype might be due to a non catalytic effect of enpp4 might be puzzling and unexpected, especially since enpp6, a closely related protein to enpp4, has been suggested to play major renal physiological role through its enzymatic functions (28). However, specific functions of other enpps have been shown to be independent of their enzymatic activity. Anti-insulin effects of enpp1 are due to its direct interaction with insulin receptor and its phosphodiesterase activity is not involved in the inhibition of insulin receptor autophosphorylation (50, 51). Enpp2 can regulate myelination by modulating oligodendrocyte-extracellular matrix interactions, an action which is independent of its catalytic activity (52). Additionally, rat enpp5, might play a role in neuronal cell communications

by mediating proteins interactions independent of its enzymatic activity (53). It is therefore possible that enpp4 does not hydrolyze PS but its interaction with PS is necessary for the activation of enpp4 and subsequently of the s1pr5 receptor. For example, PS can bind PKC and this complex would interact with DAG inducing conformational changes and activation of the PKC enzyme, which is involved in kidney formation and renal diseases (54-56). This possibility is in agreement with our biochemical analysis. We were unable to detect any of the predicted products of PS hydrolysis. Although, we cannot rule out that we failed to characterize enpp4 enzymatic activity and that enpp4 will generate a bioactive lipid, other than S1P, which is able to bind to the s1p5r, the most divergent member of the s1pr family (40).

Although signaling through S1PR5 has been poorly studied, the activation of the S1P5 receptor has been linked to an intracellular calcium increase and inactivation of the ERK pathway (57-58). The calcium and ERK pathways are both involved in pronephric field formation (59-60). The increase of ERK signaling inhibits *lhx1* and *pax8* expression in the kidney field (60). Moreover, RA signaling is involved in this fine ERK signaling tuning, crucial for kidney field establishment. Interestingly, RA signalling has also been shown to regulate sphingolipid metabolism (46, 61,62). Furthermore, as ENPP4 stimulates platelet aggregation (15) and PS exposure is responsible for the platelet procoagulant activity, it may be necessary to further investigate our proposed model between PS and ENPP4 during platelet aggregation.

We demonstrate that mouse *Enpp4* can fulfil *Xenopus enpp4* functions during pronephrogenesis. *Enpp4* is expressed in all the kidney forms in all vertebrate classes, suggesting functional roles for this protein not only in pronephros but also in the mesonephros and metanephros. ENPP4 is expressed in human metanephros and kidney tumors (data from Unigene Hs643497). Human *ENPP4* is localised on the chromosome 6 at the position 6q21.1 close to the gene *RUNX2* (NCBI website). Cleidocranial dysplasia (CCD) is an autosomal-dominant skeletal dysplasia syndrome caused by mutations of *RUNX2* (63). A recent study reported the case of a child with CDD and crossed renal ectopia (64). It is unlikely that the kidney phenotype is linked to *RUNX2* gene mutations, since no other cases of CDD with kidney defects have been reported. Although no molecular genetics have been performed in this family due to the lack of available genetic material, we could speculate this ectopic kidney might be attributable to alterations of the *ENPP4* gene locus. This would suggest that mammalian kidney formation might be regulated by a similar molecular mechanism demonstrated in this work in the *Xenopus* pronephros. Although no other studies regarding *enpp4* function have been reported, *ENPP4* expression increase has been reported in deceased donor kidney biopsies with delayed graft function after kidney transplantation (65). Moreover, the S1PR5 receptor is also expressed in

the human metanephros and kidney tumors (Unigene Hs.501561).

We propose a potentially novel model of action of the lipidic pathway in kidney physiology, implicating either bioactive lipids distinct from LPA and S1P molecules or a novel non-catalytic interaction. The fact that a S1P receptor might be activated other than by S1P binding may explain the recent polemic regarding the beneficial actions of FTY720 in renal pathologies (24). Moreover, our study raises potentially fascinating possibilities regarding regenerative therapies for renal diseases. As therapies for acute renal failure are still lacking, the identification of a novel pathway enabling the generation of ectopic kidneys may provide useful insights to therapeutics that enhance human renal regeneration. Whether this hypothesis is correct remains to be tested in future studies and generation of knock-out mice might be necessary to confirm or bring new insights on *enpp4* functions in mammalian nephrogenesis.

## Experimental procedures

### Ethics Statement

The work was carried out under a UK Home Office-approved animal procedures project licence and approved by the University of Warwick Biological Ethics Committee.

### Enpp4 Cloning and Site-Directed Mutagenesis

The *Xenopus* wild type *enpp4* cDNA (Accession number: BC 079717) was cloned into pcDNA3.1 Mouse *enpp4* cDNA (Accession number: BC027749) was cloned into pCS2+ and pcDNA3.1. Site directed-mutagenesis of the *Xenopus* wild type *enpp4* was performed by PCR and the final PCR product inserted into pCS2+ and pCDNA3.1. Detailed protocols are given in the Supplementary information.

### mRNA synthesis and morpholino oligonucleotides

Capped mRNAs were synthesized using mMESSAGE mMACHINE Kits (Ambion) from linearized plasmids. Plasmids used were *Xenopus enpp4*-pRNA3 (clone BC079717); mouse *Enpp4*-pCS2+; *Xenopus* mutant *enpp4*-pCS2+; *Xenopus*



*slp5r.a*-pCS2+ (clone DC111014); *Xenopus slp1r*-pCMV-Sport6 (clone BC074356); *Xenopus p2y10*-pCMV-Sport6 (clone BC084356) and *Xenopus rfng*-pCMV-Sport 6 (see 33). *enpp4* MO1 (5'-atgaaaacccttccaaacatcttga-3'), *enpp4* MO2 (5'-gaaatgtcacacacgcagctcctat-3'), *enpp6* MO (5'-aacgtgctgtacttagccatgccac-3'), *slp5r.a* MO (5'-catggttcgtcaatcctttatttc-3'), *slp5r.b*MO (5'-catggttcagtcagtgttatctc-3'), *rfng* MO (33) and random control MO (cMO) were designed and supplied by GeneTools, LLC. The position of the *enpp4* and *slp5r.a* and *b* MOs in relation to their respective cDNAs is indicated in the Supplementary information.

### **Embryo culture, dissection, microinjections and lineage staining.**

*Xenopus* embryos were staged according to Nieuwkoop and Faber, 1994 (66). Kidney and pronephric anlagen dissections were performed in BarthX as previously described (41). Each individual sample was injected into the lateral marginal zone of a ventral-vegetal blastomere (V2) at the 8-cell stage, along with *LacZ* (250pg) mRNA as a lineage tracer, to target the pronephros. Injected embryos were cultured to various developmental stages, fixed in MEMFA and stained for  $\beta$ -galactosidase activity to identify correctly targeted embryos. Only embryos that had normal pronephros formation on the uninjected side and correctly targeted  $\beta$ -galactosidase staining on the injected side were scored.

### **Analysis of molecular marker expression in embryos**

Wholemound immunohistochemistry was performed using 3G8 and 4A6 monoclonal antibodies as previously described (30). Whole-mount *in situ* hybridization was carried out as previously described (67). Anti-sense digoxigenin (DIG)-labelled RNA probes were synthesized from linearized template plasmids (33, 68, 69). Either BM purple (Roche Applied Science) or NBT/BCIP (Roche Applied Science) or Fast Red/ Naphthol AS/MX (Sigma) was used for the colour reaction. After bleaching, embryos were photographed with a magnification of x10 for whole stage 41 embryos; x20 for whole gastrula, neurula and early

organogenesis stages embryos and x32 for pronephric region.

### **Statistical analysis**

All experiments were repeated several times and pronephric phenotypes were determined by comparing the injected and uninjected sides blind-coded. The percentages of the embryos displaying the discussed phenotypes are given in the text in bracket along with the total number of analysed embryos. All raw data and statistical analyses are presented in the Supplementary information Tables S1-5. Each experiment was statistically pairwise analysed as indicated in the Supplementary tables. Chi-square statistic test was performed for each experiment. However, as the criteria for this statistical test were not fulfilled, Fisher's Exact Test was therefore used. FDR multiple testing correction was then applied to all statistical analyses. Chi-square and Fisher's Exact Tests were performed using the R statistical software.

### **Acrylamide embedding, cryostat sectioning and Hoechst staining**

*X.laevis* embryos were embedded sectioned at 18µm thickness and nuclear Hoechst staining performed as described previously (70).

### **RT-PCR**

RT-PCR reactions were carried out on whole or dissected *X.laevis* embryos as described previously using the housekeeping gene *odc* as loading control (71, 72). Quality of pronephric tissues dissections was assessed by amplification of the kidney markers *lhx1* and *pax8* and of the muscle marker *myf5*. Amplification conditions and primers sequences for the *enpp*, *lpar*, *slpr*, *lhx1* and *pax8* genes have been previously published (11, 40, 72). *Myf5* was amplified using the forward primer, 5'-actactacagtctcccaggacaga-3' and the reverse primer, 5'-agagtctggaatagggaggaggagca-3', with the annealing temperature of 60°C and 29 cycles.

### **Cell culturing and transient transfection**

Chinese hamster ovary (CHO) cells were cultured in HAMs F-12 (Gibco BRL) containing 10% Foetal serum, NaHCO<sub>3</sub> at 1.176g/l, 2mM of glutamine, 5U/ml penicillin and 37.8U/ml streptomycin during 48 hours before transfection.

Cells were then transfected for 24 hours using the reagent Turbofect (Fermentas) with 1 µg of the eukaryotic  $\square$  constructs. The transfection medium was then removed and replaced with culture medium. Approximately 48h post transfection, cells were fixed or harvested for analyses. As a control, CHO cells were transfected with empty vector pcDNA3.1.

### Anti-enpp4 antibody production

The anti-Xl enpp4 polyclonal antibody was raised in rabbits by direct intramuscular injection of the *Xenopus laevis* wild type *enpp4*-pcDNA3.1 plasmid followed by electroporation (Aldevron, LLC, USA). Rabbits were immunised 3 times, at day 0, day 28 and 56 and terminal bleed performed at day 70.

### Immunocytochemistry

Immunocytochemistry was carried out on fixed unpermeabilised cells with polyclonal antibody anti-Xlenpp4 used at 1/200 and anti-rabbit IgG FITC (Sigma) at 1/80. The staining was recorded using a Nikon Optiphot/ Diginet camera system. Photographs were taken at a magnification of 400.

### Electrophoresis and Western Blot

Native membrane proteins were extracted from transfected cells using the ProteoExtract® Native Membrane Protein Extraction Kit (Calbiochem). Proteins from whole cells and from the membrane and soluble fractions were separated on a 12% SDS-PAGE protein gel. Part of the gel was stained with Coomassie blue and processed for mass spectrometry analysis (Pôle Protéomique, Plateforme Génomique Fonctionnelle de Bordeaux, Université de Bordeaux) and the other was transferred onto a PVDF membrane (Bio-rad) overnight at 4°C. To limit non-specific binding, the anti-Xlenpp4 antibody was pre-absorbed on untransfected CHO cells. The membrane was incubated overnight at 4°C with 1:200 dilution of enpp4 antiserum, washed and incubated in goat anti-rabbit IgG peroxidase secondary antibody (Sigma, dilution 1/2000) for 30 minutes at 20°C. After several washes, immunoreactivity was detected by chemiluminescence (Western lighting Chemiluminescence Reagent Plus, Perkin Elmer).

### Lipid binding assay

Hydrophobic membrane prespotted with bioactive lipids (ShingoStrips™ S-6000 and Membrane Lipids Strips™ S-6002; Echelon Biosciences) were blocked 1 hour at 20°C with 1% BSA in Tris-buffered saline 0.05% Tween-20 (TBST). All subsequent washes were performed in TBST. Blots were overlaid with proteins extracts from membrane fractions of CHO cells transfected with *enpp4*-pcDNA3.1 or empty vector (dilution 1/30) in blocking buffer overnight at 4°C. Membranes were washed and incubated with preabsorbed enpp4 serum (dilution 1/200) for 6 hours at room temperature. After several washes, the membranes were incubated with goat anti-rabbit IgG peroxidase secondary antibody for 30 minutes at room temperature, washed and developed using enhanced chemiluminescence. To confirm the observed binding, nitrocellulose Hybond-C extra (GE Healthcare) membranes were spotted with 0 to 200 µM of PA (Sigma P-9511) or PS (Sigma P-6641) diluted into a mix of MeOH/CHCl<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O (2/1/0.8, v/v). Dried membranes were then treated as described above.

### Acknowledgements

We thank E. Pera for the *raldh1a2*, *ralhd10* and *cyp26a1* *in situ* probes, P. Jarrett for maintenance of frogs, B. Arveiler for helpful comments regarding human pathologies, J-W. Dupuy (Pôle Protéomique Plateforme Génomique Fonctionnelle Bordeaux, Université de Bordeaux Segalen) for MS analysis.

The authors declare no conflict of interests. The work was supported by Wellcome trust grant 082071.

### References

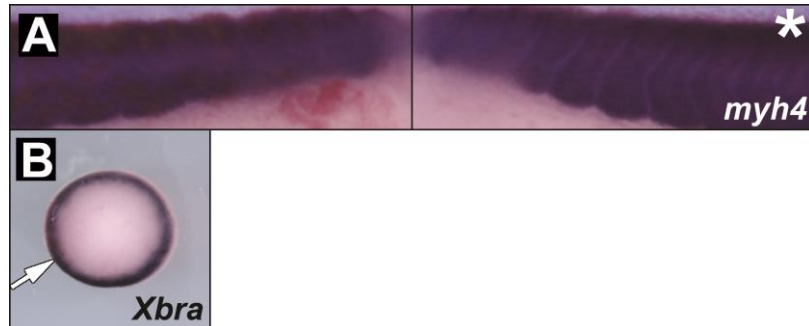
1. Brändli, A. W. (1999). Towards a molecular anatomy of the *Xenopus* pronephric kidney. *Int J Dev Biol.* **43**, 381-95
2. Jones, E.A. (2003). Molecular control of pronephric development : an overview. *The Kidney.*
3. Dressler, G.R. (2006). The cellular basis of kidney development. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **22**, 509-29.
4. Wingert, R. A. and Davidson, A. J. (2008). The zebrafish pronephros: a model to study nephron segmentation. *Kidney Int.* **73**, 1120-7.

5. Raciti, D., Reggiani, L., Geffers, L., Jiang, Q., Bacchion, F., *et al.* (2008). Organization of the pronephric kidney revealed by large-scale gene expression mapping. *Genome Biol.* **9**, R84.
6. Vize, P.D., Seufert, D. W., Carroll, T. J. and Wallingford, J. B. (1997). Model systems for the study of kidney development: use of the pronephros in the analysis of organ induction and patterning. *Dev Biol.* **188**, 189-204.
7. Drummond, I. A. (2000). The zebrafish pronephros: a genetic system for studies of kidney development. *Pediatr Nephrol.* **14**, 428-35.
8. Hostetter, C. L., Sullivan-Brown, J. L. and Burdine, R. D. (2003). Zebrafish pronephros: a model for understanding cystic kidney disease. *Dev Dyn.* **228**, 514-22.
9. Jones, E.A. (2005). *Xenopus*: a prince among models for pronephric kidney development. *J Am Soc Nephrol.* **16**, 313-21.
10. Wessely, O. and Tran, U. (2011). *Xenopus* pronephros development-past, present, and future. *Pediatr.Nephrol.* **26**, 1545-51.
11. Massé, K., Bhamra, S., Allsop, G., Dale, N. and Jones E. A. (2010). Ectophosphodiesterase/nucleotide phosphohydrolase (Enpp) nucleotidases: cloning, conservation and developmental restriction. *Int J Dev Biol.* **54**, 181-93.
12. Zimmermann, H. (1999). Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and a search for function. *Trends Pharmacol Sci.* **20**, 231-6.
13. Stefan, C., Jansen, S. and Bollen, M. (2005). NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. *Trends Biochem Sci.* **30**, 542-50.
14. Gijssbers, R., Ceulemans, H., Stalmans, W. and Bollen, M. (2001). Structural and catalytic similarities between nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases and alkaline phosphatases. *J Biol Chem.* **276**, 1361-8.
15. Albright, R.A., Chang, W.C., Robert, D., Ornstein, D.L., Cao, W., *et al.* (2012). NPP4 is a procoagulant enzyme on the surface of vascular endothelium. *Blood.* **120**, 4432-40.
16. Stefan, C., Jansen, S. and Bollen M. (2006). Modulation of purinergic signalling by NPP-type ectophosphodiesterases. *Purinergic Signal.* **2**, 361-70.
17. Nakanaga, K., Hama, K. and Aoki, J. (2010). Autotaxin--an LPA producing enzyme with diverse functions. *J Biochem.* **148**, 13-24.
18. Burnstock, G. (2007). Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci.* **64**, 1471-83
19. Choi, J. W., Herr, D. R., Noguchi, K., Yung, Y. C., Lee, C. W., *et al.* (2010). LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **50**, 157-86
20. Spiegel, S. and Milstien, S. (2003). Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 397-407.
21. Burnstock G. (2006). Purinergic signalling. *Br J Pharmacol.* **147**, S172-81.
22. Hovater, M. B., Olteanu, D., Welty, E. A. and Schwiebert, E. M. (2008). Purinergic signalling in the lumen of a normal nephron and in remodeled PKD encapsulated cysts. *Purinergic Signal.* **4**, 109-24.
23. Pradère, J. P., Gonzalez, J., Klein, J., Valet, P., Grès, S., *et al.* (2008). Lysophosphatidic acid and renal fibrosis. *Biochim Biophys Acta.* **1781**, 582-7.
24. Jo, S. K., Bajwa, A., Awad, A. S., Lynch, K. R. and Okusa, M. D. (2008). Sphingosine-1-phosphate receptors: biology and therapeutic potential in kidney disease. *Kidney Int.* **73**, 1220-30.
25. Praetorius, H. A. and Leipziger, J. (2010). Intrarenal Purinergic Signalling in the Control of Renal Tubular Transport *Annual Review of Physiology* **72**, 377-393.
26. Koch, A., Pfeilschifter, J. and Huwiler, A. (2013). Sphingosine 1-Phosphate in Renal Diseases. *Cell Physiol Biochem.* **31**, 745-760.
27. Kirby, R. J., Jin, Y., Fu, J., Cubillos, J., Swertfeger, D. and Arend, L.J. (2009). Dynamic regulation of sphingosine-1-phosphate homeostasis during development of mouse metanephric kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* **296**, F634-41.
28. Sakagami, H., Aoki, J., Natori, Y., Nishikawa, K., Kakehi, Y. *et al.* (2005). Biochemical and molecular characterization of a novel choline-specific glycerophosphodiester phosphodiesterase belonging to the nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *J Biol Chem.* **280**, 23084-93.
29. Shirley, D. G., Vekaria, R. M and Sévigny, J. (2009). Ectonucleotidases in the kidney. *Purinergic Signal.* **5**, 501-11
30. Vize, P. D., Jones, E.A. and Pfister, R. (1995). Development of the *Xenopus* pronephric system. *Dev Biol.* **171**, 531-40.
31. Reggiani, L., Raciti, D., Airik, R., Kispert, A. and Brändli, A. W. (2007). The prepattern transcription factor Irx3 directs nephron segment identity. *Genes Dev.* **21**, 2358-70.
32. Saulnier, D. M., Ghanbari, H., and Brändli, A. W. (2002). Essential function of Wnt-4 for tubulogenesis in the *Xenopus* pronephric kidney. *Dev Biol.* **248**, 13-28.
33. Naylor, R. W., and Jones, E.A. (2009). Notch activates Wnt-4 signalling to control medio-lateral patterning of the pronephros. *Development.* **136**; 3585-95.

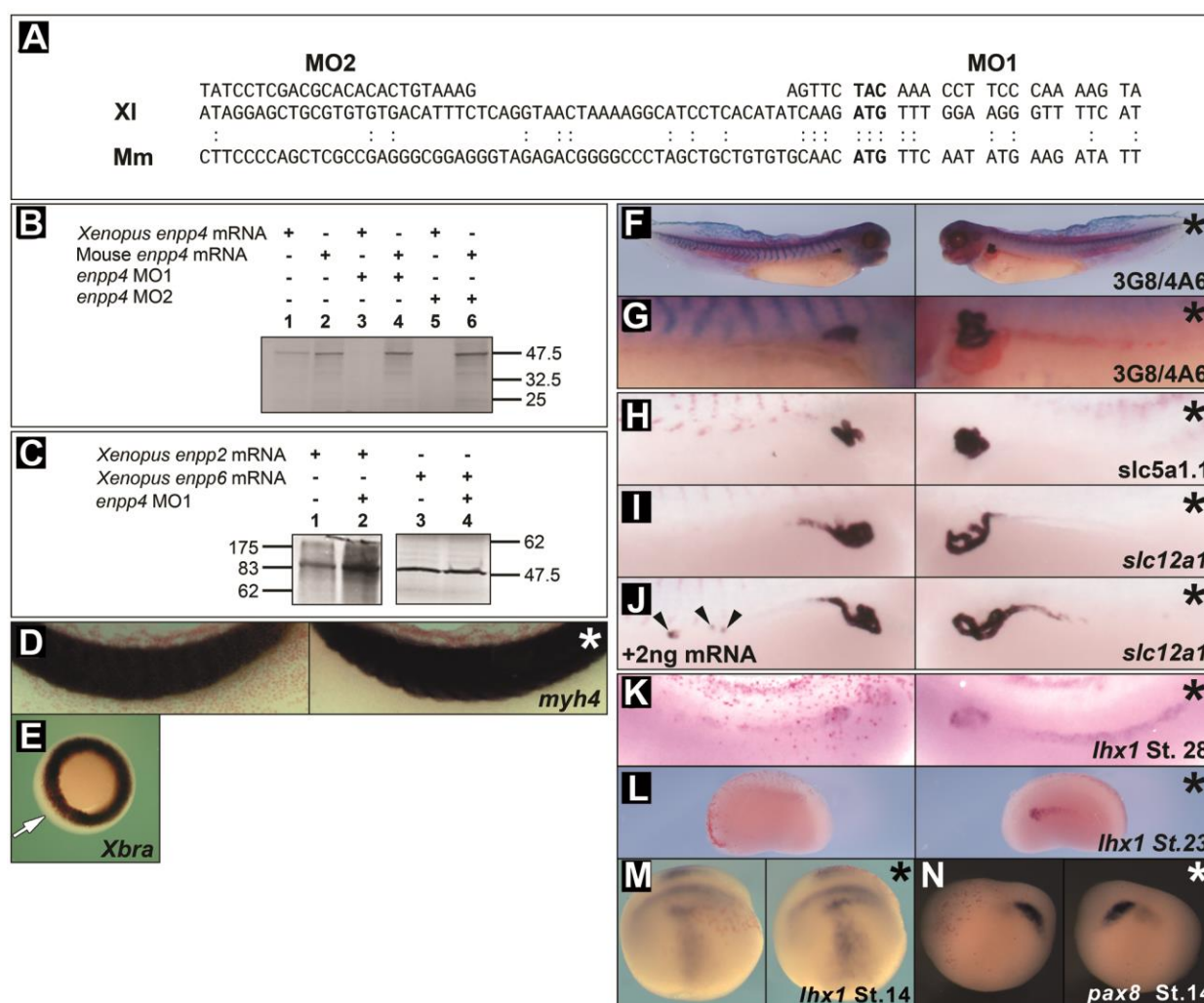
34. McLaughlin, K. A., Ronces, M. S. and Mercola, M. (2000). Notch regulates cell fate in the developing pronephros. *Dev Biol.* **227**, 567-80.
35. Taelman, V., Van Campenhout, C., Sölter, M., Pieler, T. and Bellefroid, E. J. (2006). The Notch-effector HRT1 gene plays a role in glomerular development and patterning of the *Xenopus* pronephros anlagen. *Development.* **133**, 2961-71
36. Cartry, J., Nichane, M., Ribes, V., Colas, A., Riou, J-F., *et al.* (2006). Retinoic acid signalling is required for specification of pronephric cell fate. *Dev Biol.* **299**, 35-51
37. Wingert, R. A., Selleck, R., Yu, J., Song, H. D., Chen, Z., *et al.* (2007). The *cdx* genes and retinoic acid control the positioning and segmentation of the zebrafish pronephros. *PLoS Genet.* **3**, 22-38.
38. Lyons, J. P., Miller, R. K., Zhou, X., Weidinger, G., Deroo, T., *et al.* (2009). Requirement of Wnt/beta-catenin signalling in pronephric kidney development. *Mech Dev.* **126**, 142-59.
39. Möller, S., Jung, C., Adriouch, S., Dubberke, G., Seyfried, F., *et al.* (2007). Monitoring the expression of purinoceptors and nucleotide-metabolizing ecto-enzymes with antibodies directed against proteins in native conformation. *Purinergic Signal.* **3**, 359-66.
40. Massé, K., Kyuno, J., Bhamra, S. and Jones, E. A. (2010). The LPA and S1P receptor gene families: Cloning and comparative expression analysis in *Xenopus laevis*. *Int J Dev Biol.* **54**, 1361-74.
41. Brennan, H. C., Nijjar, S. and Jones, E. A. (1998). The specification of the pronephric tubules and duct in *Xenopus laevis*. *Mech. Dev.* **75**, 127-137.
42. Chan, T. C., Takahashi, S. and Asashima, M. (2000). A role for Xlim-1 in pronephros development in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **15**, 256-69.
43. Cirio, M., Hui, Z., Haldin, C.E., Cosentino, C.C., Stuckenholtz, C., Chen, X., Hong, S-K., Dawid, I.B. and Hukriede, N.A. (2011). *Lhx1* is required for specification of the renal progenitor cell field. *Plos One.* **6**, 18858.
44. Carroll, T. and Vize, P. (1999). Synergism between Pax-8 and lim-1 in embryonic kidney development. *Dev Biol.* **214**, 46-59.
45. Van Campenhout, C., Nichane, M., Antoniou, A., Pendeville, H., Bronchain, O.J., Marine, J.C., Mazabraud, A., Voz, M.L. and Bellefroid, E.J. (2006) *Evi1* is specifically expressed in the distal tubule and duct of the *Xenopus* pronephros and plays a role in its formation. *Dev Biol.* **294**, 203-19.
46. Arima, K., Shiotsugu, J., Niu, R., Khandpur, R., Martinez, M., *et al.*, (2005). Global analysis of RAR-responsive genes in the *Xenopus* neurula using cDNA microarrays. *Dev Dyn.* **232**, 414-31.
47. Haines, N. and Irvine, K.D (2003). Glycosylation regulates Notch signaling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **4**, 786-797.
48. Leventis, P.A. and Grinstein, S. (2010). The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annu Rev Biophys.* **39**, 407-27.
49. van den Eijnde, S. M., van den Hoff, M. J., Reutelingsperger, C. P., van Heerde, W. L., Henfling, M. E., *et al.* (2001). Transient expression of phosphatidylserine at cell-cell contact areas is required for myotube formation. *J Cell Sci.* **114**, 3631-42.
50. Grupe, A., Alleman, J., Goldfine, I. D., Sadick, M. and Stewart TA. (1995). Inhibition of insulin receptor phosphorylation by PC-1 is not mediated by the hydrolysis of adenosine triphosphate or the generation of adenosine. *J Biol Chem.* **270**, 22085-8.
51. Belfiore, A., Costantino, A., Frasca, F., Pandini, G., Mineo, R., *et al.* (1996). Overexpression of membrane glycoprotein PC-1 in MDA-MB231 breast cancer cells is associated with inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity. *Mol Endocrinol.* **10**, 1318-26.
52. Dennis, J., Nogaroli, L. and Fuss, B. (2005). Phosphodiesterase-Ialpha/autotaxin (PD-Ialpha/ATX): a multifunctional protein involved in central nervous system development and disease. *J Neurosci Res.* **82**, 737-42.
53. Ohe, Y., Ohnishi, H., Okazawa, H., Tomizawa, K., Kobayashi, H., *et al.* (2003). Characterization of nucleotide pyrophosphatase-5 as an oligomannosidic glycoprotein in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun.* **308**, 719-25.
54. Bell, R. M., Hannun, Y. A. and Loomis, C. R. (1986). Mechanism of regulation of protein kinase C by lipid second messengers. *Symp Fundam Cancer Res.* **39**, 145-56.
55. Serlachius, E., Svennilson, J., Schalling, M. and Aperia A. (1997). Protein kinase C in the developing kidney: isoform expression and effects of ceramide and PKC inhibitors. *Kidney Int.* **52**, 901-10.
56. Li, J. and Gobe, G. (2006). Protein kinase C activation and its role in kidney disease. *Nephrology (Carlton).* **11**, 428-34.
57. Im, D.S., Heise, C.E., Ancellin, N., O'Dowd, B.F., Shei, G.J., *et al.* (2000) Characterization of a novel sphingosine 1-phosphate receptor, Edg-8. *J Biol Chem.* **275**, 14281-6.
58. Sanchez, T. and Hla, T. (2004) Structural and functional characteristics of S1P receptors. *J Cell Biochem.* **92**, 913-22.

- 59. Leclerc, C., Webb, S.E., Miller, A.L. and Moreau, M.** (2008). An increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> is involved in pronephric tubule differentiation in the amphibian *Xenopus laevis*. *Dev Biol.* **321**, 357-67.
- 60. Le Bouffant, R., Wang, J.H., Futel, M., Buisson, I., Umbhauer, M. and Riou, J.F.** (2012). Retinoic acid-dependent control of MAP kinase phosphatase-3 is necessary for early kidney development in *Xenopus*. *Biol Cell.* **104**, 516-32.
- 61. Somenzi, G., Sala, G., Rossetti, S., Ren, M., Ghidoni, R. and Sacchi, N.** (2007). Disruption of retinoic acid receptor alpha reveals the growth promoter face of retinoic acid. *PLoS One.* **2**, e836.
- 62. Lee, D.D., Stojadinovic, O., Krzyzanowska, A., Vouthounis, C., Blumenberg, M. et al.** (2009). Retinoid-responsive transcriptional changes in epidermal keratinocytes. *J Cell Physiol.* **220**, 427-39.
- 63. Cohen, M. M.Jr.** (2009). Perspectives on RUNX genes: an update. *Am J Med Genet A.* **149A**, 2629-46
- 64. Suresh, S.S.** (2009). A family with cleidocranial dysplasia and crossed ectopic kidney in one child. *Acta Orthop Belg.* **75**, 521-7.
- 65. Mas, V. R., Archer, K. J., Yanek, K., Dumur, C. I., Capparuccini, M. I., et al.** (2008). Gene expression patterns in deceased donor kidneys developing delayed graft function after kidney transplantation. *Transplantation.* **85**, 626-35.
- 66. Nieuwkoop, P. D. and Faber, J.** Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). *Garland Publishing, Inc. New York*, 1994.
- 67. Harland, R.M.** (1991). In situ hybridization: an improved whole-mount method for *Xenopus* embryos. *Methods Cell Biol* **36**, 685-95.
- 68. Kyuno, J., Massé, K. and Jones, E. A.** (2008). A functional screen for genes involved in *Xenopus* pronephros development. *Mech Dev.* **125**, 571-86.
- 69. Strate, I., Min, T.H., Iliev, D. and Pera, E.M.** (2009). Retinol dehydrogenase 10 is a feedback regulator of retinoic acid signalling during axis formation and patterning of the central nervous system. *Development.* **136**, 461-72
- 70. Seville, R. A., Nijjar, S., Barnett, M. W., Massé, K. and Jones, E. A.** (2002). Annexin IV (Xanx-4) has a functional role in the formation of pronephric tubules. *Development* **129**, 1693-704.
- 71. Bassez, T., Paris, J., Omilli, F., Dorel, C. and Osborne, H. B.** (1990). Posttranscriptional regulation of ornithine decarboxylase in *Xenopus laevis* oocytes. *Development* **110**, 955-62.
- 72. Haldin, C.\*, Massé, K.\*, Simrick, S., Kyuno, J. and Jones, E.A.** (2008). The *lmx1b* gene is pivotal in glomus development in *Xenopus laevis*. *Dev Biol.* **322**, 74-85. (\*These authors contributed equally.)

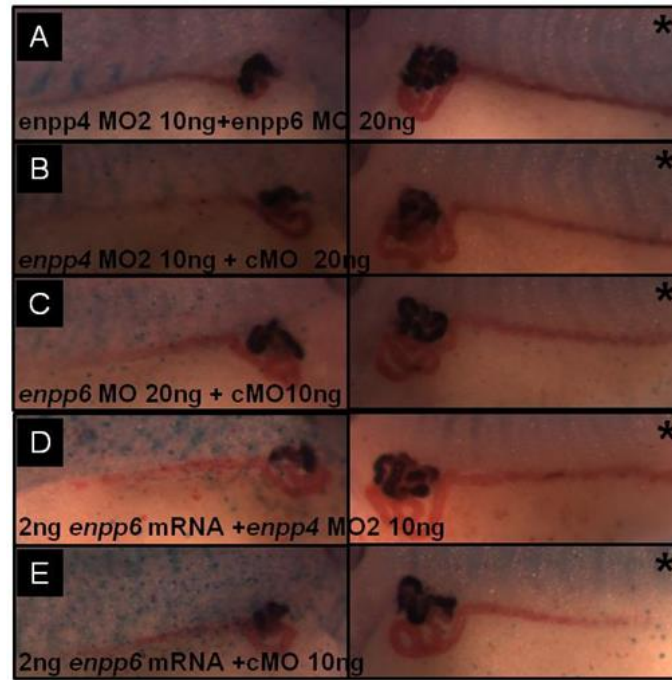
## Figures, tables and legends for supplementary information



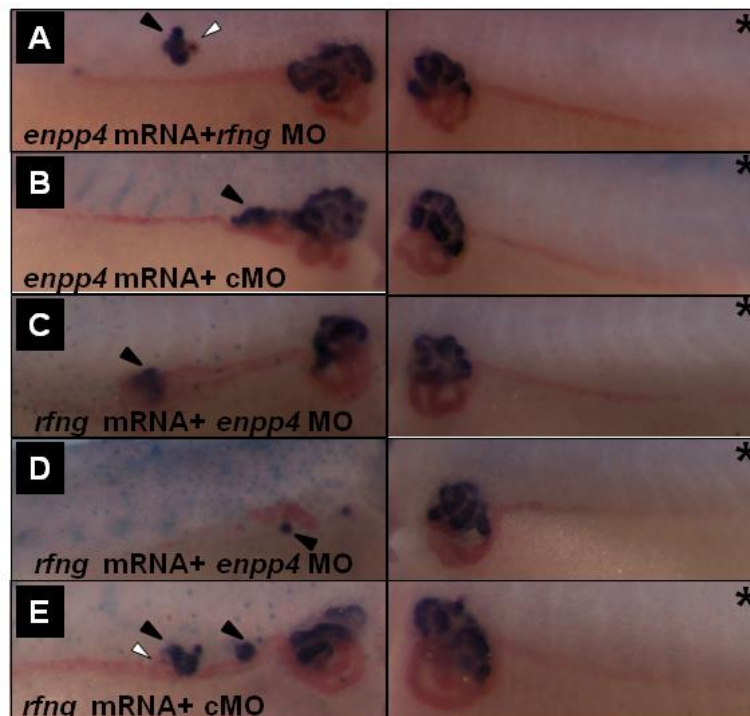
**Fig.S1. No change in mesoderm formation caused by *enpp4* overexpression (related to Fig.1).** Embryos targeted with 2ng of *enpp4* and 250 pg of *LacZ* mRNAs were examined by whole mount *in situ* hybridization with the *myh4* (A) and *xbra* (B) probes at stages 32 and 10.5 respectively. The asterisk denotes the uninjected side of each embryo. The arrow in B indicates the injection site marked by the red-gal staining.







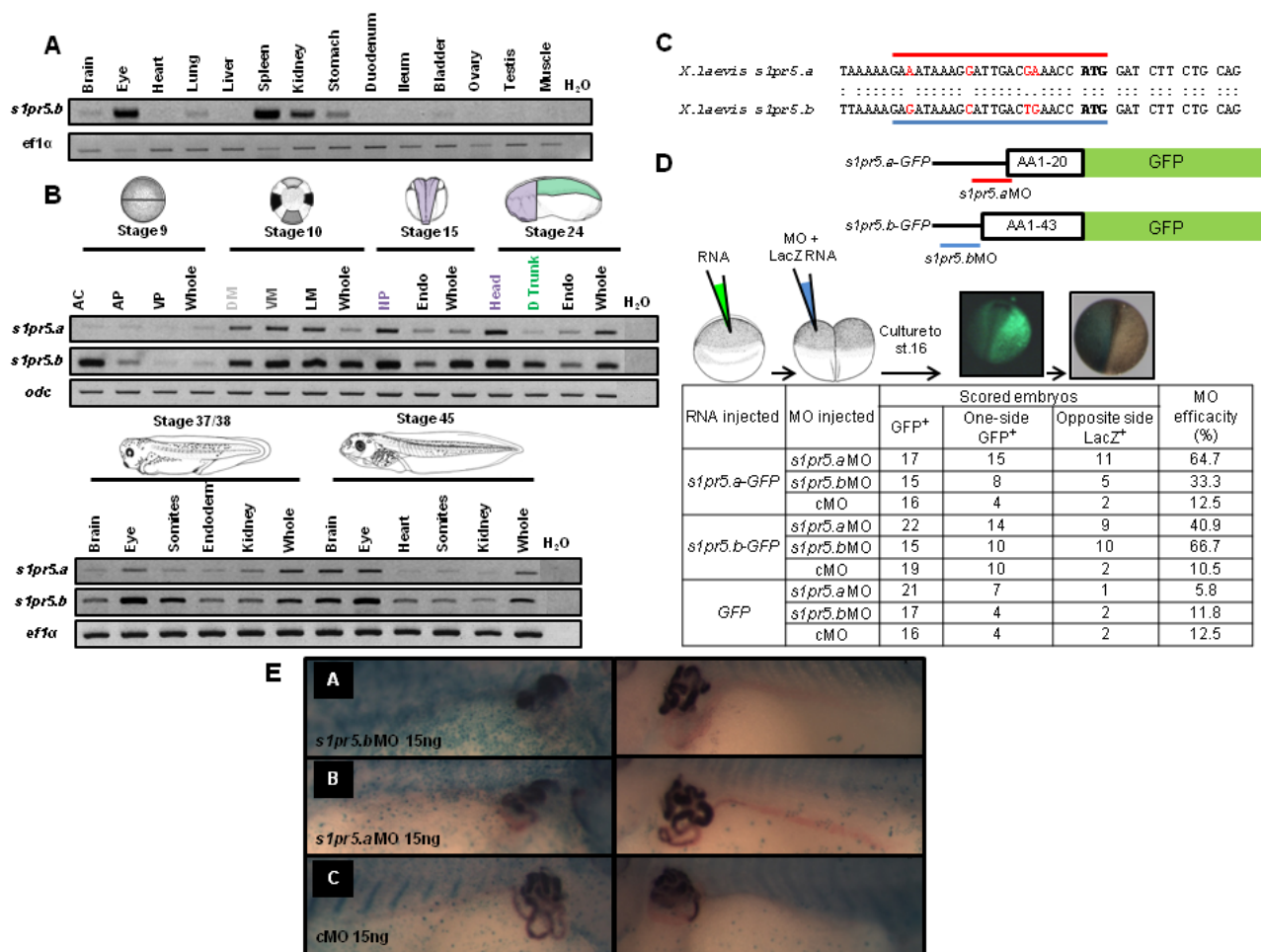
**Fig.S3. Phenotypes caused by the co-injection of the *enpp4* and *enpp6* MOs or *enpp4* MO and *enpp6* mRNA (related to Fig.2).** Injection of *enpp6* mRNA, but not *enpp6* MO, worsened the pronephric phenotypes caused by *enpp4* knock-down. Injected embryos were harvested at stage 41, and analyzed by 3G8/4A6 antibody staining. (A) Embryo injected with 10ng of *enpp4* MO2 and 20ng of *enpp6* MO. (B) Embryo injected with 10ng of *enpp4* MO2 and 20ng of control MO. (C) Embryo injected with 20ng of *enpp6* MO and 10ng of control MO. (D) Embryo injected with 2ng of *enpp6* mRNA and 10ng of *enpp4* MO. (E) Embryo injected with 2ng of *enpp6* RNA and 10 ng of control MO. Asterisk denotes uninjected sides.



**Fig.S4. Phenotypes caused by co-injection of *enpp4* or *rfng* mRNA and MO (related to Fig.3).** Injection of *rfng* MO did not prevent ectopic pronephros formation caused by *enpp4* over-expression whereas co-injection of *enpp4* MO and *rfng* mRNA altered ectopic and endogenous pronephros formation. Injected embryos were harvested at stage 40, and analyzed by 3G8/4A6 antibody staining. (A) Embryo injected with 2ng of *enpp4* mRNA and 20ng of *rfng* MO. (B) Embryo injected with 2ng of *enpp4* mRNA and 20ng of control MO. (C, D) Embryo injected with 2ng of *rfng* mRNA and 10ng of *enpp4* MO2. (E) Embryo injected 2ng of *rfng* mRNA and 10ng of control MO. Asterisk denotes uninjected sides. Black arrowheads indicate 3G8 ectopic staining and white arrowheads 4A6 ectopic staining.







**Fig.S6. Expression profile of the *slpr5.b* receptor gene, *in vivo* test of MO specificity and phenotypes caused by its knock-down (related to Fig.6).** **A.** The *slpr5.b* receptor displays a restricted expression profile in the adult frog and is expressed in the mesonephric tissue. Adult tissues were dissected and total RNA from adult tissues were extracted using Trizol (Invitrogen) following the manufacturer's protocol. RT-PCR was performed along with negative controls. **B.** The novel *slpr5.b* receptor is expressed in the kidney with an expression profile similar to its homolog, the *slpr5.a* receptor. *X.laavis* embryos were dissected and total RNA extracted. RT-PCR was performed on dissected tissues and control whole embryos along with negative controls. *Slpr5.b* was amplified using the following primers (forward primer, 5'- ggaggtctcgtgtctctc -3' and the reverse primer, 5'- cggtagctctcgtgttaacc -3') with the annealing temperature of 53°C and 32 cycles,. Each RT-PCR product was sequenced to confirm the specificity of the amplifications. **C.** Alignment of the 5'UTR of *X.laavis* *slpr5.a* and *slpr5.b* sequences and position of *slpr5.a* and *slpr5.b* MOs. The ATG is indicated in red and identical nucleotides by dots. Only 4 nucleotides over the whole MOs sequences differ between the two genes. **D.** Efficacy of the *slpr5.b* and *slpr5.a* MOs. Schematic representation of the GFP fusion proteins containing the 5'UTR and part of the coding region of *slpr5.a* and *slpr5.b*. The position of the *slpr5.a* and *slpr5.b* MO is indicated. *Xenopus* embryos were injected with the *slpr5.a*-GFP, *slpr5.b*-GFP and GFP mRNAs at one cell stage followed by unilateral injections of *slpr5.a*, *slpr5.b* and control MOs in presence of LacZ mRNA at 2-cell stage. GFP<sup>+</sup> positive embryos were sorted at stage 16 and stained for β-galactosidase activity. The numbers of embryos GFP<sup>+</sup> fluorescent on one side and LacZ<sup>+</sup> on the opposite side and the percentage of efficiency of the different MOs to inhibit *in vivo* the translation of the different mRNAs are indicated in the table. **E.** Microinjection of *slpr5.b* MO induces a similar kidney phenotype than the microinjection of the *slpr5.a* MO. Injected embryos were harvested at stage 41, and analyzed by 3G8/4A6 antibody staining. (A) Embryo injected with 15ng of *slpr5.b* MO (B) Embryo injected with 15ng of *slpr5.a* MO. (C) Embryo injected with 15ng of control MO. Asterisk denotes uninjected sides.

**Table S1A**

Figure	Injection	Marker analysed	Phenotypes					Total number of scored embryos
			Normal	Enlarged	Reduced	Absent	Ectopic	
1B-E	<i>enpp4</i> mRNA 2ng	3G8	51%	18%	8%	0%	23%	91
1B-E	<i>enpp4</i> mRNA 2ng	4A6	69%	20%	9%	0%	2%	91
1M	Mouse <i>enpp4</i> mRNA 2ng	3G8	30%	0%	13%	2%	55%	63
1M	Mouse <i>enpp4</i> mRNA 2ng	4A6	51%	19%	17%	2%	11%	63
1N	<i>enpp4</i> T72S mRNA 2ng	3G8	76%	2%	22%	0%	0%	66
1N	<i>enpp4</i> T72S mRNA 2ng	4A6	79%	0%	21%	0%	0%	66
	<i>enpp4</i> T72A mRNA 2ng	3G8	68%	2%	29%	0%	1%	62
	<i>enpp4</i> T72A mRNA 2ng	4A6	82%	0%	18%	0%	0%	62
1O	<i>enpp4</i> D36N mRNA 2ng	3G8	77%	9%	13%	0%	1%	69
1O	<i>enpp4</i> D36N mRNA 2ng	4A6	90%	1%	9%	0%	0%	69
	<i>enpp4</i> D189N mRNA 2ng	3G8	75%	3%	10%	5%	7%	76
	<i>enpp4</i> D189N mRNA 2ng	4A6	90%	1%	5%	4%	0%	76
	<i>LacZ</i> mRNA 250pg	3G8	91%	0%	9%	0%	0%	57
	<i>LacZ</i> mRNA 250pg	4A6	93%	0%	7%	0%	0%	57
1P	<i>enpp4</i> mRNA 2ng	<i>slc5a1.1</i>	47%	14%	9%	0%	30%	57
	<i>LacZ</i> mRNA 250pg	<i>slc5a1.1</i>	94%	0%	5%	1%	0%	64
1Q	<i>enpp4</i> mRNA 2ng	<i>slc12a1</i>	53%	25%	5%	0%	17%	57
	<i>LacZ</i> mRNA 250pg	<i>slc12a1</i>	98%	0%	2%	0%	0%	64
1R	<i>enpp4</i> mRNA 2ng	<i>clcnkb</i>	69%	19%	12%	0%	0%	58
	<i>LacZ</i> mRNA 250pg	<i>clcnkb</i>	94%	0%	3%	3%	0%	64
1S	<i>enpp4</i> mRNA 2ng	<i>gata3</i>	40%	2%	58%	0%	0%	43
	<i>LacZ</i> mRNA 250pg	<i>gata3</i>	89%	0%	11%	0%	0%	37
1T	<i>enpp4</i> mRNA 2ng	<i>wt1</i>	44%	34%	22%	0%	0%	59
	<i>LacZ</i> mRNA 250pg	<i>wt1</i>	96%	1%	3%	0%	0%	88
1U	<i>enpp4</i> mRNA 2ng	<i>nphs1</i>	37%	25%	34%	1%	3%	88
	<i>LacZ</i> mRNA 250pg	<i>nphs1</i>	96%	0%	4%	0%	0%	54
1V	<i>enpp4</i> mRNA 2ng	<i>lhx1</i>	39%	61%	0%	0%	0%	51
	<i>LacZ</i> mRNA 250pg	<i>lhx1</i>	96%	1%	3%	0%	0%	79
1W	<i>enpp4</i> mRNA 2ng	<i>pax8</i>	28%	70%	0%	0%	2%	50
	<i>LacZ</i> mRNA 250pg	<i>pax8</i>	97%	0%	3%	0%	0%	74
1X	<i>enpp4</i> mRNA 2ng	<i>lhx1</i>	65%	20%	15%	0%	0%	46
	<i>LacZ</i> mRNA 250pg	<i>lhx1</i>	67%	9%	24%	0%	0%	42
1Y	<i>enpp4</i> mRNA 2ng	<i>pax8</i>	29%	17%	34%	0%	20%	70
	<i>LacZ</i> mRNA 250pg	<i>pax8</i>	60%	3%	37%	0%	0%	57
S1A	<i>enpp4</i> mRNA 2ng	<i>myh4</i>	100%	0%	0%	0%	0%	55
	<i>LacZ</i> mRNA 250pg	<i>myh4</i>	98%	0%	0%	0%	2%	54
S1B	<i>enpp4</i> mRNA 2ng	<i>xbra</i>	85%	0%	15%	0%	0%	46
	<i>LacZ</i> mRNA 250pg	<i>xbra</i>	88%	0%	12%	0%	0%	52

**Table S1B:**

Figure compared	Injections compared	Marker	Statistical test	Number of embryos	p-value (with FDR correction)
1B-E	<i>enpp4/LacZ</i>	3G8	Fisher's exact	148	0.001
1B-E	<i>enpp4/LacZ</i>	4A6	Fisher's exact	148	0.001
1M	<i>Enpp4(mouse)/LacZ</i>	3G8	Fisher's exact	120	0.001
1M	<i>Enpp4(mouse)/LacZ</i>	4A6	Fisher's exact	120	0.001
1P	<i>enpp4/LacZ</i>	<i>slc5a1.1</i>	Fisher's exact	121	0.001
1Q	<i>enpp4/LacZ</i>	<i>sclt12a1</i>	Fisher's exact	121	0.001
1R	<i>enpp4/LacZ</i>	<i>clcnkb</i>	Fisher's exact	122	0.001
1S	<i>enpp4/LacZ</i>	<i>gata3</i>	Fisher's exact	80	0.001
1T	<i>enpp4/LacZ</i>	<i>wt1</i>	Fisher's exact	147	0.001
1U	<i>enpp4/LacZ</i>	<i>nphs1</i>	Fisher's exact	142	0.001
1V	<i>enpp4/LacZ</i>	<i>lhx1</i> (st28)	Fisher's exact	130	0.001
1W	<i>enpp4/LacZ</i>	<i>pax8</i> (st28)	Fisher's exact	124	0.001
1X	<i>enpp4/LacZ</i>	<i>lhx1</i> (neurula)	Fisher's exact	88	NS
1Y	<i>enpp4/LacZ</i>	<i>pax8</i> (neurula)	Fisher's exact	128	0.001
S1A	<i>enpp4/LacZ</i>	<i>myh4</i>	Fisher's exact	109	NS
S1B	<i>enpp4/LacZ</i>	<i>xbra</i>	Fisher's exact	98	NS

**Table S1C:**

Figure compared	Injections compared	Marker	Statistical test	Number of embryos	p-value (with FDR correction)
1N/1C	<i>enpp4T72A/enpp4</i>	3G8	Fisher's exact	153	0.001
1N/1C	<i>enpp4T72A/ enpp4</i>	4A6	Fisher's exact	153	0.001
1N/1C	<i>enpp4T72S/ enpp4</i>	3G8	Fisher's exact	157	0.001
1N/1C	<i>enpp4T72S/ enpp4</i>	4A6	Fisher's test	157	0.001
1O/1C	<i>enpp4D36N/ enpp4</i>	3G8	Fisher's exact	160	0.001
1O/1C	<i>enpp4D36N/ enpp4</i>	4A6	Fisher's test	160	0.001
1O/1C	<i>enpp4D189N/ enpp4</i>	3G8	Fisher's test	167	0.001
1O/1C	<i>enpp4D189N/ enpp4</i>	4A6	Fisher's test	167	0.001

**Table S1. Scoring analysis of kidney phenotypes in embryos over-expressing *enpp4* mRNAs (related to Fig.1 and S1).** (A) Results from immunohistochemistry and *in situ* hybridization of injected embryos. Embryos were injected with *enpp4* wild type or mutant RNA. Embryos were scored for differences between the injected side (identified by Blue or Red Gal staining) and uninjected side acting as contra-lateral control side. Only the pronephros phenotype on the injected side is indicated. (B) Statistical analyses for the *enpp4* over-expression experiments. Each single experiment was scored against the *LacZ* injected embryos. The FDR multiple testing correction was applied to all Fisher's Exact Test and a standardized value is given for the calculated *p* value. NS: not significant. (C) Statistical analyses of the results for the *enpp4* mutant injection experiments. The mutant *enpp4* embryos were scored against the *enpp4* mRNA injected embryos. The FDR multiple testing correction was applied to all Fisher's Exact Test and a standardized value is given for the calculated *p* value. NS: not significant

Table S2A:

Figure	Injection	Marker analysed	Normal	Phenotypes				Total number of scored embryos
				Enlarged	Reduced	Absent	Ectopic	
2A, B	<i>enpp4</i> MO1 10ng	3G8	35%	0%	65%	0%	0%	107
2A, B	<i>enpp4</i> MO1 10ng	4A6	63%	0%	28%	9%	0%	107
	cMO 10ng	3G8	100%	0%	0%	0%	0%	27
	cMO 10ng	4A6	100%	0%	0%	0%	0%	27
2C	<i>enpp4</i> MO1 10ng+MO2 10ng	3G8	10%	0%	90%	0%	0%	20
2C	<i>enpp4</i> MO1 10ng+MO2 10ng	4A6	0%	0%	75%	25%	0%	20
	<i>enpp4</i> MO1 10ng + cMO 10ng	3G8	33%	0%	67%	0%	0%	15
	<i>enpp4</i> MO1 10ng + cMO 10ng	4A6	47%	0%	53%	0%	0%	15
	<i>enpp4</i> MO2 10ng + cMO 10ng	3G8	56%	0%	44%	0%	0%	16
	<i>enpp4</i> MO2 10ng + cMO 10ng	4A6	44%	0%	56%	0%	0%	16
	cMO 20ng	3G8	59%	0%	41%	0%	0%	17
	cMO 20ng	4A6	53%	0%	47%	0%	0%	17
2D	<i>enpp4</i> MO1 10ng	<i>slc5a1.1</i>	42%	0%	58%	0%	0%	64
	cMO 10ng	<i>slc5a1.1</i>	100%	0%	0%	0%	0%	34
2E	<i>enpp4</i> MO1 10ng	<i>slc12a1</i>	44%	0%	56%	0%	0%	75
2F	<i>enpp4</i> MO1 10ng + <i>enpp4</i> mRNA 2ng	<i>slc12a1</i>	65%	0%	24%	0%	11%	72
	cMO 10ng	<i>slc12a1</i>	83%	0%	17%	0%	0%	47
2G	<i>enpp4</i> MO1 10ng	<i>clcnkb</i>	47%	0%	53%	0%	0%	40
	cMO 10ng	<i>clcnkb</i>	76%	0%	24%	0%	0%	55
2H	<i>enpp4</i> MO1 10ng	<i>gata3</i>	69%	0%	31%	0%	0%	42
	cMO 10ng	<i>gata3</i>	89%	0%	11%	0%	0%	37
2I	<i>enpp4</i> MO1 10ng	<i>wt1</i>	94%	3%	3%	0%	0%	34
	cMO 10ng	<i>wt1</i>	94%	0%	6%	0%	0%	34
2J	<i>enpp4</i> MO1 10ng	<i>nphs1</i>	83%	2%	15%	0%	0%	41
	cMO 10ng	<i>nphs1</i>	92%	2%	6%	0%	0%	49
2K	<i>enpp4</i> MO1 10ng	<i>lhx1</i>	65%	0%	35%	0%	0%	23
	cMO 10ng	<i>lhx1</i>	100%	0%	0%	0%	0%	21
2L	<i>enpp4</i> MO1 10ng	<i>lhx1</i>	25%	0%	75%	0%	0%	20
	cMO 10ng	<i>lhx1</i>	70%	0%	30%	0%	0%	20
2M	<i>enpp4</i> MO1 10ng + cMO 10ng	<i>lhx1</i>	31%	0%	37%	31%	0%	46
2N	<i>enpp4</i> MO1 10ng+MO2 10ng	<i>lhx1</i>	16%	6%	58%	19%	0%	31
	cMO 20ng	<i>lhx1</i>	77%	10%	13%	0%	0%	39
2O	<i>enpp4</i> MO1 10ng + cMO 10ng	<i>pax8</i>	29%	1%	70%	0%	0%	70
	cMO 20ng	<i>pax8</i>	63%	15%	22%	0%	0%	27
S2D	<i>enpp4</i> MO1 10ng	<i>myh4</i>	100%	0%	0%	0%	0%	47
	cMO 10ng	<i>myh4</i>	100%	0%	0%	0%	0%	59
S2E	<i>enpp4</i> MO1 10ng	<i>xbra</i>	84%	0%	16%	0%	0%	19
	cMO 10ng	<i>xbra</i>	95%	0%	5%	0%	0%	21
S2F,G	<i>enpp4</i> MO2 10ng	3G8	51%	0%	49%	0%	0%	87
S2F,G	<i>enpp4</i> MO2 10ng	4A6	76%	0%	24%	0%	0%	87
S2H	<i>enpp4</i> MO2 10ng	<i>slc5a1.1</i>	68%	0%	32%	0%	0%	38
S2I	<i>enpp4</i> MO2 10ng	<i>slc5a12a1</i>	86%	0%	14%	0%	0%	28
S2J	<i>enpp4</i> MO2 10ng + <i>enpp4</i> mRNA 2ng	<i>slc5a12a1</i>	50%	0%	0%	0%	50%	28
S2K	<i>enpp4</i> MO2 10ng	<i>lhx1</i>	55%	15%	30%	0%	0%	20
S2L	<i>enpp4</i> MO2 10ng	<i>lhx1</i>	45%	0%	55%	0%	0%	20

Figure	Injection	Marker analysed	Normal	Enlarged	Phenotypes			Total number of scored embryos
					Reduced	Absent	Ectopic	
S2M	<i>enpp4</i> MO2 10ng + cMO 10ng	<i>lhx1</i>	31%	5%	64%	0%	0%	61
S2N	<i>enpp4</i> MO2 10ng + cMO 10ng	<i>pax8</i>	21%	0%	58%	21%	0%	19
S3A	<i>enpp6</i> MO 20ng + <i>enpp4</i> MO2 10ng + <i>enpp6</i> MO 20ng	3G8	33%	0%	64%	3%	0%	76
		4A6	37%	0%	62%	1%	0%	76
S3B	<i>enpp4</i> MO2 10ng + cMO 20ng	3G8	40%	0%	57%	3%	0%	68
	<i>enpp4</i> MO2 10ng + cMO 20ng	4A6	32%	0%	62%	6%	0%	68
S3C	<i>enpp6</i> MO 20ng + cMO 10ng	3G8	47%	0%	51%	2%	0%	66
	<i>enpp6</i> MO2 20ng + cMO 10ng	4A6	35%	0%	63%	2%	0%	66
	cMO 30ng	3G8	70%	0%	30%	0%	0%	63
	cMO 30ng	4A6	86%	0%	14%	0%	0%	63
S3D	<i>enpp6</i> mRNA 2ng + <i>enpp4</i> MO2 10ng	3G8	20%	0%	63%	17%	0%	71
	<i>enpp6</i> mRNA 2ng + <i>enpp4</i> MO2 10ng	4A6	34%	0%	39%	27%	0%	71
	<i>enpp4</i> MO2 10ng	3G8	47%	0%	51%	2%	0%	49
	<i>enpp4</i> MO2 10ng	4A6	57%	0%	43%	0%	0%	49
S3E	<i>enpp6</i> mRNA 2ng + cMO 10ng	3G8	3%	0%	79%	18%	0%	34
	<i>enpp6</i> mRNA 2ng + cMO 10ng	4A6	12%	0%	65%	23%	0%	34

**Table S2B:**

Figure compared	Injections compared	Marker	Statistical test	Number of embryos	p-value (with FDR correction)
2B	<i>enpp4</i> MO1/cMO	3G8	Fisher's exact	134	0.001
2B	<i>enpp4</i> MO1/ cMO	4A6	Fisher's exact	134	0.001
S2G	<i>enpp4</i> MO2/ cMO	3G8	Fisher's exact	114	0.001
S2G	<i>enpp4</i> MO2/ cMO	4A6	Fisher's exact	114	0.01
2C/2B	<i>enpp4</i> MO1+2/MO1	3G8	Fisher's exact	35	NS
2C/2B	<i>enpp4</i> MO1+2/MO1	4A6	Fisher's exact	35	0.001
2C/S2G	<i>enpp4</i> MO1+2/MO2	3G8	Fisher's exact	36	0.01
2C/S2G	<i>enpp4</i> MO1+2/MO2	4A6	Fisher's exact	36	0.001
S3A/S3B	<i>enpp6</i> MO+ <i>enpp4</i> MO2/ <i>enpp4</i> MO2	3G8	Fisher's exact	144	NS
S3A/S3B	<i>enpp6</i> MO+ <i>enpp4</i> MO2/ <i>enpp4</i> MO2	4A6	Fisher's exact	144	NS
S3A/3C	<i>enpp6</i> MO+ <i>enpp4</i> MO2/ <i>enpp6</i> MO	3G8	Fisher's exact	142	NS
S3A/3C	<i>enpp6</i> MO+ <i>enpp4</i> MO2/ <i>enpp6</i> MO	4A6	Fisher's exact	142	NS
S3A	<i>enpp6</i> MO+ <i>enpp4</i> MO2/cMO	3G8	Fisher's exact	139	0.001
S3A	<i>enpp6</i> MO+ <i>enpp4</i> MO2/cMO	4A6	Fisher's exact	139	0.001
S3C	<i>enpp6</i> MO/ <i>enpp4</i> MO2	3G8	Fisher's exact	134	NS
S3C	<i>enpp6</i> MO/ <i>enpp4</i> MO2	4A6	Fisher's exact	134	NS
S3D/S3B	<i>enpp6</i> RNA+ <i>enpp4</i> MO2/ <i>enpp4</i> MO2	3G8	Fisher's exact	120	0.001
S3D/S3B	<i>enpp6</i> RNA+ <i>enpp4</i> MO2/ <i>enpp4</i> MO2	4A6	Fisher's exact	120	0.001
S3D/S3E	<i>enpp6</i> RNA+ <i>enpp4</i> MO2/ <i>enpp6</i> RNA+cMO	3G8	Fisher's exact	142	NS
S3D/S3E	<i>enpp6</i> RNA+ <i>enpp4</i> MO2/ <i>enpp6</i> RNA+cMO	4A6	Fisher's exact	142	0.05
2D	<i>enpp4</i> MO1/cMO	<i>slc5a1.1</i>	Fisher's exact	98	0.001
S2H	<i>enpp4</i> MO2/cMO	<i>slc5a1.1</i>	Fisher's exact	72	0.001
2E	<i>enpp4</i> MO1/cMO	<i>slc12a1</i>	Fisher's exact	122	0.001
S2I	<i>enpp4</i> MO2/cMO	<i>slc12a1</i>	Fisher's exact	75	NS
2F/2E	<i>enpp4</i> MO1+RNA/ <i>enpp4</i> MO1	<i>slc12a1</i>	Fisher's exact	147	0.001
S2J/S2H	<i>enpp4</i> MO2+RNA/ <i>enpp4</i> MO2	<i>slc12a1</i>	Fisher's exact	56	0.001
2G	<i>enpp4</i> MO1/cMO	<i>clcnkb</i>	Fisher's exact	95	0.01
2H	<i>enpp4</i> MO1/cMO	<i>gata3</i>	Fisher's exact	79	NS
2I	<i>enpp4</i> MO1/cMO	<i>wt1</i>	Fisher's exact	68	NS
2J	<i>enpp4</i> MO1/cMO	<i>nphs1</i>	Fisher's exact	90	NS
2K	<i>enpp4</i> MO1/cMO	<i>lhx1</i> (st28)	Fisher's exact	44	0.01
S2K	<i>enpp4</i> MO2/cMO	<i>lhx1</i> (st28)	Fisher's exact	41	0.001

2L	<i>enpp4</i> MO1/cMO	<i>lhx1</i> (st22)	Fisher's exact	40	0,05
S2L	<i>enpp4</i> MO2/cMO	<i>lhx1</i> (st22)	Fisher's exact	40	NS
2M	<i>enpp4</i> MO1/cMO	<i>lhx1</i> (neurula)	Fisher's exact	85	0,001
S2M	<i>enpp4</i> MO2/cMO	<i>lhx1</i> (neurula)	Fisher's exact	100	0.001
2N	<i>enpp4</i> MO1+2/cMO	<i>lhx1</i> (neurula)	Fisher's exact	70	0.001
2N/2M	<i>enpp4</i> MO1+2/MO1	<i>lhx1</i> (neurula)	Fisher's exact	77	NS
2N/S2M	<i>enpp4</i> MO1+2/MO2	<i>lhx1</i> (neurula)	Fisher's exact	92	0.01
2O	<i>enpp4</i> MO1/cMO	<i>pax8</i> (neurula)	Fisher's exact	97	0.001
S2N	<i>enpp4</i> MO2/cMO	<i>pax8</i> (neurula)	Fisher's exact	46	0.001

**Table S2. Scoring analysis of kidney phenotypes in embryos micro-injected with *enpp4* MOs (related to Fig.2 and S2).** (A) Results from immunohistochemistry and *in situ* hybridization of injected embryos. Embryos were injected with *enpp4* MO1 or MO2 alone or in combination. Embryos were scored for differences between the injected side (identified by Blue or Red Gal staining) and uninjected side acting as contra-lateral control side. Only the pronephros phenotype on the injected side is indicated.

(B) Statistical analyses of the results for the *enpp4* knock down experiments. Each experiment was scored as indicated in the table. The FDR multiple testing correction was applied to all Fisher's Exact Test and a standardized value is given for the calculated *p* value. NS: not significant.

**Table S3A:**

Figure	Injection	Marker stained	Phenotypes					Total number of scored embryos
			Normal	Enlarged	Reduced	Absent	Ectopic	
3A	<i>enpp4</i> mRNA 2ng	<i>raldh1a2</i>	32%	22%	11%	0%	35%	37
3B	<i>enpp4</i> mRNA 2ng	<i>rdh10</i>	53%	35%	0%	0%	12%	34
3C	<i>enpp4</i> mRNA 2ng	<i>cyp26a1</i>	98%	2%	0%	0%	0%	44
3D	<i>enpp4</i> mRNA 2ng	<i>notch1</i>	23%	53%	17%	0%	7%	75
3E	<i>enpp4</i> mRNA 2ng	<i>dll1</i>	24%	23%	9%	4%	40%	81
3F	<i>enpp4</i> mRNA 2ng	<i>jag1</i>	26%	44%	10%	0%	20%	81
3G	<i>enpp4</i> mRNA 2ng	<i>wnt4</i>	24%	32%	27%	0%	17%	41
3H	<i>enpp4</i> MO1 10ng	<i>raldh1a2</i>	75%	0%	25%	0%	0%	33
	cMO 10ng	<i>raldh1a2</i>	97%	0%	3%	0%	0%	35
3I	<i>enpp4</i> MO1 10ng	<i>rdh10</i>	79%	0%	21%	0%	0%	33
	cMO 10ng	<i>rdh10</i>	100%	0%	0%	0%	0%	47
3J	<i>enpp4</i> MO1 10ng	<i>cyp26a1</i>	88%	0%	12%	0%	0%	42
	cMO 10ng	<i>cyp26a1</i>	93%	0%	7%	0%	0%	46
3K	<i>enpp4</i> MO1 10ng	<i>notch1</i>	80%	10%	10%	0%	0%	41
	cMO 10ng	<i>notch1</i>	97%	3%	0%	0%	0%	40
3L	<i>enpp4</i> MO1 10ng	<i>dll1</i>	67%	0%	33%	0%	0%	46
	cMO 10ng	<i>dll1</i>	85%	3%	12%	0%	0%	40
3M	<i>enpp4</i> MO1 10ng	<i>jag1</i>	62%	0%	38%	0%	0%	42
	cMO 10ng	<i>jag1</i>	95%	0%	5%	0%	0%	41
3N	<i>enpp4</i> MO1 10ng	<i>wnt4</i>	10%	0%	82%	0%	0%	33
	cMO 10ng	<i>wnt4</i>	85%	0%	15%	0%	0%	33
S4A	<i>enpp4</i> mRNA 2ng + <i>rfng</i> MO 20ng	3G8	24%	3%	32%	0%	41%	37
	<i>enpp4</i> mRNA 2ng + <i>rfng</i> MO 20ng	4A6	54%	0%	32%	0%	14%	37
S4B	<i>enpp4</i> mRNA 2ng + cMO 20ng	3G8	48%	6%	23%	0%	23%	31
	<i>enpp4</i> mRNA 2ng + cMO 20ng	4A6	68%	0%	23%	0%	9%	31
S4C,D	<i>rfng</i> mRNA 2ng + <i>enpp4</i> MO2 10ng	3G8	20%	0	40%	13%	27%	15
	<i>rfng</i> mRNA 2ng + <i>enpp4</i> MO2 10ng	4A6	27%	0%	53%	7%	13%	15
S4E	<i>rfng</i> mRNA 2ng + cMO 10ng	3G8	38%	0%	19%	5%	38%	21
	<i>rfng</i> mRNA 2ng + cMO 10ng	4A6	43%	0%	38%	0%	19%	21
	<i>enpp4</i> MO2 10ng	3G8	28%	0%	72%	0%	0%	18
	<i>enpp4</i> MO2 10ng	4A6	33%	0%	67%	0%	0%	18
	<i>rfng</i> MO 20ng	3G8	53%	0%	48%	0%	0%	19
	<i>rfng</i> MO 20ng	4A6	84%	0%	16%	0%	0%	19
	cMO 20ng	3G8	78%	0%	22%	0%	0%	31
	cMO 20ng	4A6	78%	0%	22%	0%	0%	31



**Table S3B:**

Figure	Injections compared	marker	Statistical test	Number of embryos	p-value (with FDR correction)
3H	<i>enpp4</i> MO/cMO	<i>raldh1a2</i>	Fisher's exact	68	0.05
3I	<i>enpp4</i> MO/cMO	<i>rdh10</i>	Fisher's exact	80	0.01
3J	<i>enpp4</i> MO/cMO	<i>Cyp26a1</i>	Fisher's exact	88	NS
3K	<i>enpp4</i> MO/cMO	<i>notch1</i>	Fisher's exact	81	0.05
3L	<i>enpp4</i> MO/cMO	<i>dll1</i>	Fisher's exact	86	0.05
3M	<i>enpp4</i> MO/cMO	<i>jag1</i>	Fisher's exact	83	0.001
3N	<i>enpp4</i> MO/cMO	<i>wnt4</i>	Fisher's exact	66	0.001
S4C,D/S4E	<i>enpp4</i> MO2+ <i>rfng</i> RNA/cMO+ <i>rfng</i> RNA	3G8	Fisher's exact	36	NS
S4C,D/S4E	<i>enpp4</i> MO2+ <i>rfng</i> RNA/cMO+ <i>rfng</i> RNA	4A6	Fisher's exact	36	NS
S4A/s4B	<i>rfng</i> MO+ <i>enpp4</i> RNA/cMO+ <i>enpp4</i> RNA	3G8	Fisher's exact	68	NS
S4A/S4B	<i>rfng</i> MO+ <i>enpp4</i> RNA/cMO+ <i>enpp4</i> RNA	4A6	Fisher's exact	68	NS

**Table S3. Scoring analysis of *enpp4* mis-expression on RA, Notch and Wnt signalling pathways (related to Fig.3 and S4).** (A) Results from immunohistochemistry and *in situ* hybridization of injected embryos. Embryos were injected with *enpp4* RNA or MO alone or in combination with *rfng* RNA or MO. Embryos were scored for differences between the injected side (identified by Blue or Red Gal staining) and uninjected side acting as contra-lateral control side. Only the pronephros phenotype on the injected side is indicated. (B) Statistical analyses of the results for each experiment. Each *enpp4* MO injection experiment was scored against control (c) MO injected embryos. The combined experiments were scored as indicated in the table. The FDR multiple testing correction was applied to all Fisher's Exact Test and a standardized value is given for the calculated *p* value. NS: not significant

**Table S4A:**

Figure	Injection	Marker stained	Phenotypes					Total number of scored embryos
			Normal	Enlarged	Reduced	Absent	Ectopic	
6A,B	<i>s1pr5.a</i> mRNA 2ng + <i>enpp4</i> mRNA 1ng	3G8	33%	2%	26%	1%	38%	89
6A,B	<i>s1pr.a</i> mRNA 2ng + <i>enpp4</i> mRNA 1ng	4A6	44%	12%	34%	1%	9%	89
6C	<i>s1pr5.a</i> mRNA 2ng	3G8	73%	2%	23%	2%	0%	52
6C	<i>s1pr5.a</i> mRNA 2ng	4A6	81%	4%	13%	2%	0%	52
6D	<i>enpp4</i> mRNA 1ng	3G8	72%	8%	15%	0%	5%	94
6D	<i>enpp4</i> mRNA 1ng <i>s1pr1</i> mRNA 2ng	4A6	72%	8%	15%	0%	5%	94
S5A	+ <i>enpp4</i> mRNA 1ng <i>s1pr1</i> mRNA 2ng	3G8	64%	13%	15%	0%	8%	89
S5A	+ <i>enpp4</i> mRNA 1ng	4A6	63%	14%	22%	0%	1%	89
S5B	<i>s1pr1</i> mRNA 2ng	3G8	90%	5%	3%	2%	0%	58
S5B	<i>s1pr1</i> mRNA 2ng <i>lpar1.1</i> mRNA 2ng	4A6	91%	0%	9%	0%	0%	58
S5C	+ <i>enpp4</i> mRNA 1ng <i>lpar1.1</i> mRNA 2ng	3G8	65%	14%	7%	2%	12%	106
S5C	+ <i>enpp4</i> mRNA 1ng	4A6	76%	11%	7%	2%	4%	106
S5D	<i>lpar1.1</i> mRNA 2ng	3G8	96%	0%	4%	0%	0%	55
S5D	<i>lpar1.1</i> mRNA 2ng <i>p2yr10</i> mRNA 2ng	4A6	96%	0%	4%	0%	0%	55
S5E	+ <i>enpp4</i> mRNA 1ng <i>p2yr10</i> mRNA 2ng	3G8	78%	12%	4%	2%	4%	51
S5E	+ <i>enpp4</i> mRNA 1ng	4A6	88%	6%	2%	4%	0%	51
S5F	<i>p2yr10</i> mRNA 2ng	3G8	90%	4%	6%	0%	0%	54
S5F	<i>p2yr10</i> mRNA 2ng	4A6	98%	0%	2%	0%	0%	54
	<i>LacZ</i> mRNA 250pg	3G8	93%	0%	7%	0%	0%	58
	<i>LacZ</i> mRNA 250pg	4A6	95%	0%	5%	0%	0%	58
6E,F	<i>s1pr5.a</i> MO 15ng	3G8	56%	5%	37%	0%	2%	43
6E,F	<i>s1pr5.a</i> MO 15ng	4A6	40%	0%	60%	0%	0%	43
	cMO 15ng	3G8	90%	0%	10%	0%	0%	61
	cMO 15ng	4A6	87%	0%	13%	0%	0%	61
6G,H	<i>s1pr5.a</i> MO 7.5ng + <i>enpp4</i> MO 5ng	3G8	26%	0%	74%	0%	0%	42
6G,H	<i>s1pr5.a</i> MO 7.5ng + <i>enpp4</i> MO 5ng	4A6	19%	0%	81%	0%	0%	42
6I	<i>s1pr5.a</i> MO 7.5ng + Control MO 5ng	3G8	78%	0%	22%	0%	0%	51
6I	<i>s1pr5.a</i> MO 7.5ng + Control MO 5ng	4A6	71%	0%	29%	0%	0%	51
6J	Control MO 7.5ng + <i>enpp4</i> MO 5ng	3G8	35%	0%	65%	0%	0%	40
6J	Control MO 7.5ng + <i>enpp4</i> MO 5ng	4A6	40%	0%	60%	0%	0%	40
	cMO 12.5ng	3G8	93%	5%	2%	0%	0%	44
	cMO 12.5ng	4A6	96%	2%	2%	0%	0%	44
6K	<i>enpp4</i> 2ng mRNA + <i>s1pr5.a</i> MO 15ng	3G8	47.5%	7.5%	42.5%	0%	17.5%	40
	<i>enpp4</i> 2ng mRNA + <i>s1pr5.a</i> MO 15ng	4A6	55%	15%	30%	0%	0%	40
	<i>s1pr5.a</i> MO 15ng	3G8	71%	6%	26%	0%	0%	35
	<i>s1pr5.a</i> MO 15ng	4A6	57%	3%	45%	0%	0%	35
6L	<i>enpp4</i> 2ng mRNA + cMO 15ng	3G8	50%	24%	26%	0%	48%	50
	<i>enpp4</i> 2ng mRNA + cMO 15ng	4A6	64%	14%	24%	0%	10%	50
	cMO 15ng	3G8	76%	3%	21%	0%	0%	29
	cMO 15ng	4A6	90%	3%	7%	0%	0%	29
S6E	<i>s1pr5.b</i> MO 15ng	3G8	38%	0%	51%	11%	0%	66

Figure	Injection	Marker stained	Phenotypes					Total number of scored embryos
			Normal	Enlarged	Reduced	Absent	Ectopic	
	<i>s1pr5.b</i> MO 15ng	4A6	39%	0%	29%	32%	0%	66
	<i>s1pr5.a</i> MO 15ng	3G8	21%	9%	49%	21%	0%	57
	<i>s1pr5.a</i> MO 15ng	4A6	39%	0%	16%	45%	0%	57
	<i>cMO</i> 15ng	3G8	72%	3%	21%	4%	0%	67
	<i>cMO</i> 15ng	4A6	67%	1%	18%	14%	0%	67

**Table S4B:**

Figure	Injection compared	marker	Statistical test	Number of embryos	p-value (with FDR correction)
6A,B/6D	<i>s1pr5.a+enpp4/enpp4</i>	3G8	Fisher's exact	183	0.001
6A,B/6D	<i>s1pr5.a +enpp4/enpp4</i>	4A6	Fisher's exact	183	0.01
6A,B/6C	<i>s1pr5.a+enpp4/s1pr5.a</i>	3G8	Fisher's exact	141	0.001
6A,B/6C	<i>s1pr5.a+enpp4/s1pr5.a</i>	4A6	Fisher's exact	141	0.001
6C	<i>s1pr5.a/ LacZ</i>	3G8	Fisher's exact	110	0.01
6C	<i>s1pr5.a/ LacZ</i>	4A6	Fisher's exact	110	NS
S5A/6D	<i>s1pr1+enpp4/enpp4</i>	3G8	Fisher's exact	183	NS
S5A/6D	<i>s1pr1+enpp4/enpp4</i>	4A6	Fisher's exact	183	NS
S5A/S5B	<i>s1pr1+enpp4/s1pr1</i>	3G8	Fisher's exact	147	0.01
S5A/S5B	<i>s1pr1+enpp4/s1pr1</i>	4A6	Fisher's exact	147	0.001
S5B	<i>s1pr1/ LacZ</i>	3G8	Fisher's exact	116	NS
S5B	<i>s1pr1/LacZ</i>	4A6	Fisher's exact	116	NS
S5C/6D	<i>lpar1.1+enpp4/enpp4</i>	3G8	Fisher's exact	200	0.05
S5C/6D	<i>lpar1.1+enpp4/enpp4</i>	4A6	Fisher's exact	200	NS
S5C/S5D	<i>lpar1.1+enpp4/ lpar1.1</i>	3G8	Fisher's exact	161	0.001
S5C/S5D	<i>lpar1.1+enpp4/ lpar1.1</i>	4A6	Fisher's exact	161	0.01
S5D	<i>lpar1.1/LacZ</i>	3G8	Fisher's exact	113	NS
S5D	<i>lpar1.1/LacZ</i>	4A6	Fisher's exact	113	NS
S5E/6D	<i>p2y10+enpp4/enpp4</i>	3G8	Fisher's exact	145	NS
S5E/6D	<i>p2y10+enpp4/enpp4</i>	4A6	Fisher's exact	145	0.01
S5E/S5F	<i>p2y10+enpp4/p2y10</i>	3G8	Fisher's exact	105	NS
S5E/S5F	<i>p2y10+enpp4/p2y10</i>	4A6	Fisher's exact	105	NS
S5F	<i>p2y10/ LacZ</i>	3G8	Fisher's exact	112	NS
S5F	<i>p2y10/ LacZ</i>	4A6	Fisher's exact	112	NS
6E,F	<i>s1pr5.aMO/cMO</i>	3G8	Fisher's exact	104	0.001
6E,F	<i>s1pr5.aMO/ cMO</i>	4A6	Fisher's exact	104	0.001
S6E	<i>s1pr5.bMO/ cMO</i>	3G8	Fisher's exact	133	0.001
S6E	<i>s1pr5.bMO/ cMO</i>	4A6	Fisher's exact	133	0.01
S6E/6F	<i>s1pr5.bMO/ s1pr5.aMO</i>	3G8	Fisher's exact	123	0.05
S6E/6F	<i>s1pr5.bMO/ s1pr5.aMO</i>	4A6	Fisher's exact	123	NS
6G,H/6I	<i>s1pr5.aMO+enpp4MO/ s1pr5.a MO +cMO</i>	3G8	Fisher's exact	93	0.001
6G,H/6I	<i>s1pr5.aMO+enpp4MO/ s1pr5.a MO +cMO</i>	4A6	Fisher's exact	93	0.001
6G,H/6J	<i>s1pr5.aMO+enpp4MO/ enpp4 MO +cMO</i>	3G8	Fisher's exact	82	NS
6G,H/6J	<i>s1pr5.aMO+enpp4MO/ enpp4 MO +cMO</i>	4A6	Fisher's exact	82	NS
6K/6L	<i>enpp4RNA+s1pr5.aMO /enpp4RNA+cMO</i>	3G8	Fisher's exact	90	0.01
6K/6L	<i>enpp4RNA+s1pr5.aMO /enpp4RNA+cMO</i>	4A6	Fisher's exact	90	NS

**Table S4. Scoring analysis of 3G8/4A6 staining in embryos mis-expressing *enpp4* and lipidic receptors (related to for Fig.6, S5 and S6).** (A) Results from immunohistochemistry of injected embryos. Embryos were either injected with *s1pr1*, *s1pr5.a*, *lpar1.1*, *p2y10* and *enpp4* mRNA alone or in combination or with *s1pr5.a*, *s1pr5.b* and *enpp4* MO alone or in combination. Embryos were scored for differences between the injected side (identified by Blue Gal staining) and uninjected side acting as contra-lateral control side. Only the pronephros phenotype on the injected side is indicated. (B) Statistical analyses of the results for each experiment. Each single injection experiment was scored against *LacZ* mRNA or control (c) MO injected embryos. The combined experiments were scored as indicated in the table. The FDR multiple testing correction was applied to all Fisher's Exact Test and a standardized value is given for the calculated *p* value. NS: not significant.

**Table S5:**

Class (0,0.001)	
Injection compared	Analyzed marker
enpp4+LacZ/LacZ	3G8
enpp4+LacZ/LacZ	4A6
mouseEnpp4+LacZ/LacZ	3G8
mouseEnpp4+LacZ/LacZ	4A6
enpp4+LacZ/LacZ	slc5a1.1
enpp4+LacZ/LacZ	slc12a1
enpp4+LacZ/LacZ	clcnkb
enpp4+LacZ/LacZ	gata3
enpp4+LacZ/LacZ	wt1
enpp4+LacZ/LacZ	nphs1
enpp4+LacZ/LacZ	lhx1_st28
enpp4+LacZ/LacZ	pax8_st28
enpp4+LacZ/LacZ	pax8_neurula
enpp4T72A+LacZ/enpp4+LacZ	3G
enpp4T72A+LacZ/enpp4+LacZ	4A6
enpp4T72S+LacZ/enpp4+LacZ	3G8
enpp4T72S+LacZ/enpp4+LacZ	4A6
enpp4D36N+LacZ/enpp4+LacZ	3G8
enpp4D36N+LacZ/enpp4+LacZ	4A6
enpp4D189N+LacZ/enpp4+LacZ	3G8
enpp4D189N+LacZ/enpp4+LacZ	4A6
enpp4MO1/cMO	3G8
enpp4MO1/cMO	4A6
enpp4MO2/cMO	3G8
enpp4MO1+2/enpp4MO1	4A6
enpp4MO1+2/enpp4 MO2	4A6
enpp4 MO2+enpp6MO/cMO	3G8
enpp4 MO2+enpp6MO/cMO	4A6
Xl enpp6 mRNA+enpp4 MO2/ MO2	3G8
Xl enpp6 mRNA+enpp4 MO2/ MO2	4A6
enpp4MO1/cMO	slc5a1.1
enpp4MO2/cMO	slc5a1.1
enpp4MO1/cMO	slc12a1
enpp4MO1+enpp4 RNA/enpp4MO1	slc12a1
enpp4MO1+enpp4 RNA/enpp4MO2	slc12a1
enpp4MO2/cMO	lhx1_st28
enpp4MO1/cMO	lhx1_neurula
enpp4MO2/cMO	lhx1_neurula
enpp4MO1+2/cMO	lhx1_neurula
enpp4MO1/cMO	pax8_neurula
enpp4MO2/cMO	pax8_neurula
enpp4MO1/cMO	jag1
enpp4MO1/cMO	wnt4
S1PR5RNA+enpp4/enpp4 1ng	3G8
S1PR5RNA+enpp4/s1pr5 mRNA 2ng	3G8
S1PR5RNA+enpp4/s1pr5 mRNA 2ng	4A6
S1PR1RNA+enpp4/s1pr1 mRNA 2ng	4A6
lpar1.1RNA+enpp4/lpar1.1 mRNA 2ng	3G8
s1pr5aMO/cMO	3G8
s1pr5aMO/cMO	4A6
s1pr5bMO/cMO	3G8
s1pr5aMO+enpp4MO/s1pr5aMO+cMO	3G8
s1pr5aMO+enpp4MO/s1pr5aMO+cMO	4A6
Class (0.001,0.01)	
enpp4MO2/cMO	4A6
enpp4MO1+2/enpp4 MO2	3G8
enpp4MO1/cMO	clcnkb
enpp4MO1/cMO	lhx1_st28
enpp4MO1+2/enpp4MO2	lhx1_neurula
enpp4MO1/cMO	ralh10
s1pr5 mRNA 2ng /LacZ	3G8
S1PR5RNA+enpp4/enpp4 1ng	4A6
S1PR1RNA+enpp4/s1pr1 mRNA 2ng	3G8
lpar1.1RNA+enpp4/lpar1.1 mRNA 2ng	4A6
p2y10 RNA+enpp4/enpp4 1ng	4A6
s1pr5bMO/cMO	4A6
s1pr5aMO+enpp4mRNA/cMO+enpp4 mRNA	3G8
Class (0.01,0.05)	
Xl enpp6 mRNA+enpp4 MO2/Xl enpp6 mRNA+cMO	4A6
enpp4MO1/cMO	lhx1_st22
enpp4MO1/cMO	ralh1a2
enpp4MO1/cMO	notch1

enpp4MO1/cMO	dll1
lpar1.1RNA+enpp4/enpp4 1ng	3G8
s1pr5aMO/s1pr5bMO	3G8
<b>Class (0.05,1)</b>	
enpp4+LacZ/LacZ	lhx1_neurul
enpp4+LacZ/LacZ	myh4
enpp4+LacZ/LacZ	xbra
enpp4MO1+2/enpp4MO1	3G8
enpp4 MO2+enpp6MO/enpp4 MO2	3G8
enpp4 MO2+enpp6MO/enpp6MO	3G8
enpp4 MO2/enpp6MO	3G8
enpp4 MO2/enpp6MO	4A6
enpp4 MO2+enpp6MO/enpp4 MO2	4A6
enpp4 MO2+enpp6MO/enpp6MO	4A6
X1 enpp6 mRNA+enpp4 MO2/X1 enpp6 mRNA+cMO	3G8
enpp4MO2/cMO	slc12a
enpp4MO1/cMO	gata3
enpp4MO1/cMO	wt1
enpp4MO1/cMO	nphs1
enpp4MO2/cMO	lhx1_st22
enpp4MO1+2/enpp4MO1	lhx1_neurula
enpp4MO1/cMO	cyp26a1
enpp4MO2+rnfg mRNA/cMO+rnfg mRNA	3G8
enpp4MO2+rnfg mRNA/cMO+rnfg mRNA	4A6
rnfgMO+enpp4mRNA/cMO+enpp4mRNA	3G8
rnfgMO+enpp4mRNA/cMO+enpp4mRNA	4A6
s1pr5 mRNA 2ng /LacZ	4A6
S1PR1RNA+enpp4/enpp4 1ng	3G8
S1PR1RNA+enpp4/enpp4 1ng	4A6
s1pr1 mRNA /LacZ	3G8
s1pr1 mRNA /LacZ	4A6
lpar1.1 mRNA 2ng /LacZ	3G8
lpar1.1 mRNA 2ng /LacZ	4A6
lpar1.1RNA+enpp4/enpp4 1ng	4A6
p2y10 RNA+enpp4/enpp4 1ng	3G8
p2y10 RNA+enpp4/p2y10 mRNA 2ng	3G8
p2y10 RNA+enpp4/p2y10 mRNA 2ng	4A6
p2y10 mRNA 2ng /LacZ	3G8
p2y10 mRNA 2ng /LacZ	4A6
s1pr5aMO/s1pr5bMO	4A6
s1pr5aMO+enpp4MO/enpp4MO+cMO	3G8
s1pr5aMO+enpp4MO/enpp4MO+cMO	4A6
s1pr5aMO+enpp4mRNA/cMO+enpp4 mRNA	4A6

**Table S5:** Summary of the statistical analyses ranked according to the significance. The FDR multiple testing correction was applied to all Fisher's Exact Tests and a standardized value is given for the calculated  $p$  value. Results considered as significant are those with  $p < 0.05$ .

## Supplemental Experimental Procedures

### Site-directed mutagenesis of *Xenopus* enpp4

Site-directed mutagenesis of *Xenopus* enpp4 was performed using a PCR-based approach. For each mutant, 2 successive rounds of PCR were carried out using the Pfx polymerase (Invitrogen) following the manufacturer's protocol and using the primers listed below. The first round of PCR, performed using the *enpp4*-pRNA3 plasmid as template, allowed the amplification of two fragments of the enpp4 coding region, one upstream and containing the desired mutation (underscored in the primer sequence) and the other downstream and containing the mutation respectively. For this, one amplification was performed using the upstream primer carrying out the mutation and the primer ORF downstream containing the stop codon and the other amplification using the downstream primer carrying out the mutation and the primer ORF upstream containing the ATG codon. The two PCR products were then mixed and a third PCR was carried out using this mixture as template using the upstream and downstream ORF primers, carrying out the *Bam*HI and *Eco*RI restriction sites respectively (in italic in the primer sequence). The final PCR product was digested by *Bam*HI and *Eco*RI and inserted into the pCS2+ vector. The presence of the correct mutation was confirmed by sequencing for each mutant. The mutant *enpp4* cDNA was then extracted from the pCS2+ and cloned into the pcDNA3.1.

enpp4T72AU 5'-ataaccaaggcttccccaaccattac-3'

enpp4T72AD 5'-gttggggaaggccttccttatgaagac-3'

enpp4T72SU 5'-ataaccaagaggttccccaaccattac-3'

enpp4T72SD 5'-gttggggaaacttccttatgaagac-3'

enpp4D36NU 5'-ttatccttcaacggattccgggccgat-3'

enpp4D36ND 5'-ccggaatccgttgaaggataagagaat-3'

enpp4D189NU 5'-gaggagcctaacgcaagcggacaccgt-3'

enpp4D189ND 5'-tccgcttgcgttaggctcctccagta-3'

enpp4ORFU 5'-cgggatccATGtttgaagggttttc-3'

enpp4ORFD 5'-cggaattcCTAaccaatcagaggatc-3'

### Generation of the s1pr5.a-GFP and s1pr5.b-GFP constructs.

The pCS2-s1pr5.a-GFP and pCS2-s1pr5.b-GFP constructs were generated by PCR. A fragment of s1pr5.a and s1pr5.b 5'UTR and coding region was amplified from adult spleen cDNA using the Phusion Taq (New England BioLabs) following the manufacturer's protocol and using the primers listed below, carrying out *Eco*RI and *Xba*I restriction sites respectively (in italic in the primer sequence). The PCR product was digested by *Eco*RI and *Xba*I and inserted into the pCS2+-GFP vector. The conservation of the reading frame between s1pr5 and GFP coding regions and the absence of mutation were confirmed by sequencing.

s1pr5.aF: 5'-ggaattcggatcctcacagactcttataaagc-3'

s1pr5.aR: 5'-gctcgagctctagaatggtactctgtacaatcgg-3'

s1pr5.bF: 5'-ggaattcggatccataaacctgcaggcaatcag-3'

s1pr5.bR: 5'-gctcgagctctagaaccaccctgtacactactggtg-3'